

Aus dem Laboratorium für Pharmakologie und
Toxikologie am Fachbereich Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Versuche zum Nachweis einer Toleranz und akuten Toleranz gegen die antikonvulsive Wirkung von Diazepam beim Hund

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Hans-Peter Philippin
Tierarzt aus Rutesheim

Berlin 1984
Journal-Nr. 1165



Aus dem Laboratorium für Pharmakologie und
Toxikologie am Fachbereich Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Versuche zum Nachweis einer Toleranz und akuten Toleranz
gegen die antikonvulsive Wirkung von Diazepam beim Hund

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Hans-Peter Philippin
Tierarzt aus Rutesheim

Berlin 1984
Journal-Nr. 1165

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereiches Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Fachbereichssprecher :	Prof. Dr. F. Hörchner
Referent :	Prof. Dr. H.-H. Frey
Co-Referent :	Priv.-Doz. Dr. D. Schmidt

Tag der Promotion :

16. Januar 1984

Meinen Töchtern

Meinen Töchtern
die ich liebe und die mich lieben

Meinen Töchtern
die ich liebe und die mich lieben

Meinen Töchtern
die ich liebe und die mich lieben

Meinen Töchtern
die ich liebe und die mich lieben

Meinen Töchtern
die ich liebe und die mich lieben

Meinen Töchtern
die ich liebe und die mich lieben

Meinen Töchtern
die ich liebe und die mich lieben

Meinen Töchtern
die ich liebe und die mich lieben

Meinen Töchtern
die ich liebe und die mich lieben

Meinen Töchtern
die ich liebe und die mich lieben

Meinen Töchtern
die ich liebe und die mich lieben

Meinen Töchtern
die ich liebe und die mich lieben

Meinen Töchtern
die ich liebe und die mich lieben

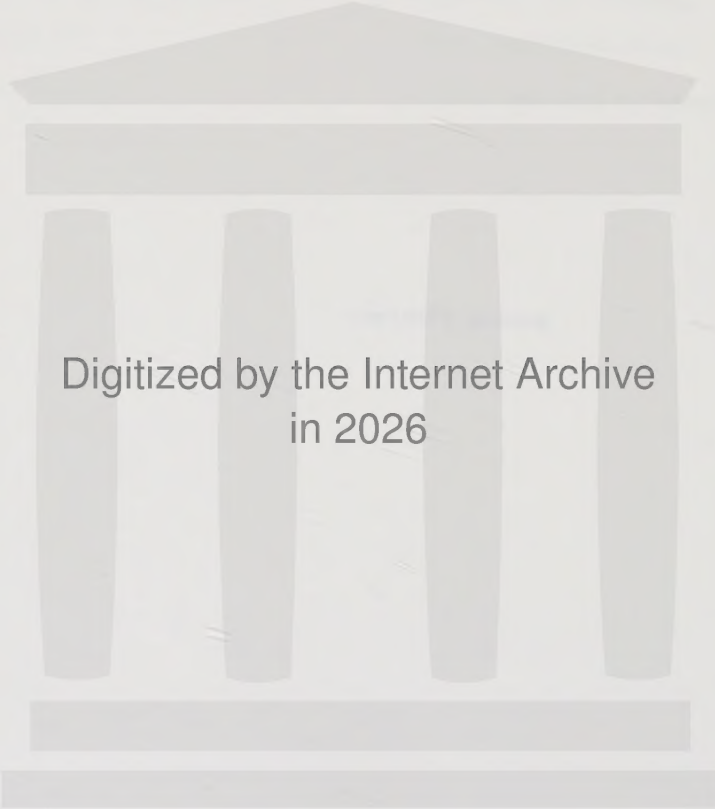
Meinen Töchtern
die ich liebe und die mich lieben

Meinen Töchtern

Meinen Töchtern
die ich liebe und die mich lieben

Meinen Töchtern

Meinen Töchtern
die ich liebe und die mich lieben



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548822_0053

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

	<u>Seite</u>
1. EINLEITUNG	1
2. LITERATUR	2
2.1. Diazepam	2
2.2. Biotransformation von Diazepam	2
2.3. Pharmakokinetik von Diazepam	2
2.4. Pharmakodynamik	5
2.5. Pentetrazol (PTZ)	11
2.6. Toleranz	13
3. EIGENE UNTERSUCHUNGEN	20
3.1. Methodik	20
3.1.1. Tiermaterial	20
3.1.2. Verwendete Substanzen	20
3.1.3. Versuche zum Nachweis der Toleranz bei subakuter Behandlungsweise	21
3.1.3.1. Bestimmung der Krampfschwellen	21
3.1.3.2. Berechnung des Krampfschwellen-Wertes	22
3.1.3.3. Behandlung mit 0,25 mg/kg Diazepam	22
3.1.3.4. Behandlung mit 0,5 mg/kg Diazepam	23
3.1.3.5. Diazepam/Chlorazepat Behandlung	23
3.1.3.6. NDD/Chlorazepat Behandlung	23
3.1.3.6.1. Herstellung der NDD-Lösung (1%)	24
3.1.4. Versuche zum Nachweis der akuten Toleranz	24
3.1.4.1. Versuchsvorbereitungen	24
3.1.4.1.1. Elektrodenimplantation	24
3.1.4.1.2. Versuchsvorbereitungen am Versuchstag	25
3.1.4.2. Versuchsdurchführung	28
3.1.4.3. Versuchsauswertung	29
3.1.4.4. Analytik	31
3.1.4.4.1. Gaschromatographische Bestimmung der Plasma- konzentrationen von Diazepam und seinen Metaboliten	31
3.1.4.4.2. Gaschromatographische Bestimmung der PTZ- Plasma- und Liquorkonzentrationen	31

	<u>Seite</u>
3.2. Ergebnisse	34
3.2.1. Subakute Behandlung	34
3.2.1.1. Behandlung mit 0,25 mg/kg Diazepam	34
3.2.1.2. Behandlung mit 0,5 mg/kg Diazepam	34
3.2.1.3. Behandlung mit Diazepam/Chlorazepat	34
3.2.1.4. Behandlung mit NDD/Chlorazepat	35
3.2.1.5. Vergleich der antikonvulsiven Wirkungs- stärke von Diazepam gegenüber NDD	44
3.2.2. Ergebnisse der Versuche zum Nachweis der akuten Toleranz	46
3.2.2.1. Beschreibung der Elektroenzephalogramme	46
3.2.2.1.1. EEG vor Pentetrazol-Gabe	46
3.2.2.1.2. EEG während der PTZ-Bolusgabe	46
3.2.2.1.3. EEG vor und nach Gabe von Diazepam	48
3.2.2.2. Herzfrequenz während der Versuche mit NDD und Diazepam	49
3.2.2.3. Blutdruck	49
3.2.2.4. Körpertemperatur	49
3.2.2.5. Ergebnisse der Versuche mit Diazepam	50
3.2.2.6. Ergebnisse der Versuche mit NDD	58
3.2.3. Vergleich der PTZ-Plasma- und Liquor- konzentrationen	61
4. DISKUSSION	62
5. ZUSAMMENFASSUNG - SUMMARY	68
6. LITERATURVERZEICHNIS	70

1. EINLEITUNG

Benzodiazepine sind die am häufigsten verschriebenen Arzneimittel im allgemeinen therapeutischen Gebrauch in der Humanmedizin (Tallman 1980). Sie zeichnen sich durch anxiolytische, sedative, muskelrelaxierende und antikonvulsive Wirkungskomponenten aus. Bei den verschiedenen Anwendungsgebieten der Benzodiazepine wird in zahlreichen Veröffentlichungen über das Auftreten eines Phänomens berichtet, das als Toleranz bezeichnet wird und als klinisches Problem bei der therapeutischen Anwendung dieser Stoffklasse betrachtet werden muß.

Hierbei muß erwähnt werden, daß die Toleranz nicht nur als Benzodiazepin-spezifisches Problem angesehen werden kann, sondern auch bei einer Vielzahl weiterer Stoffklassen auftritt. Eine Übersicht über die Toleranz gegenüber Nicht-Opiaten erschien im Handbuch der experimentellen Pharmakologie (Smith 1977).

Bei der vorliegenden Arbeit ging es ausschließlich um den Nachweis der Toleranz und der akuten Toleranz hinsichtlich der antikonvulsiven Wirkungsqualität von Diazepam beim Hund.

Besonders berücksichtigt wurde in diesem Zusammenhang der Einsatz von Benzodiazepinen bei der Behandlung epileptischer Erkrankungen.

Zum experimentellen Nachweis der Toleranz wurden die Hunde ein bzw. zwei Wochen mit Diazepam und N-Desmethyldiazepam (NDD), dem Hauptmetaboliten von Diazepam, behandelt. An Hand der dabei entnommenen und gaschromatographisch untersuchten Blutproben sollte geklärt werden, inwieweit die Ursache der Toleranz metabolischer oder funktioneller Natur ist.

Die akute Toleranz stellt sich als klinisches Problem bei der Behandlung des Status epilepticus dar. Sowohl in der Human-, als auch in der Veterinärmedizin ist hierbei Diazepam Mittel der Wahl. Mittels eines geeigneten Modells wurde versucht, das Auftreten der akuten Toleranz bei Diazepam- und bei NDD-Behandlung aufzuzeigen.

Mit dem verwendeten experimentellen Aufbau wurde erstmalig eine Methode beschrieben, die es erlaubt, am höheren Versuchstier antikonvulsiv wirkende Stoffe hinsichtlich ihrer Toleranzentwicklung zu prüfen.



2. LITERATUR

2.1. Diazepam

Diazepam ist eine gelbliche, kristalline Substanz mit einem Schmelzpunkt von 125-127°C. Es wurde 1961 von Sternbach und Reeder synthetisiert. Sein chemischer Name ist 7-Chlor-1,3 dihydro-1-methyl-5 phenyl-2H-1,4 benzodiazepin 2-on, mit der Summenformel $C_{16}H_{13}Cl N_2O$. Das Molekulargewicht beträgt 284,8. Diazepam ist gut in organischen Lösungsmitteln wie Chloroform, Ethanol und Diethylether löslich. Der pKa liegt bei 3,4.

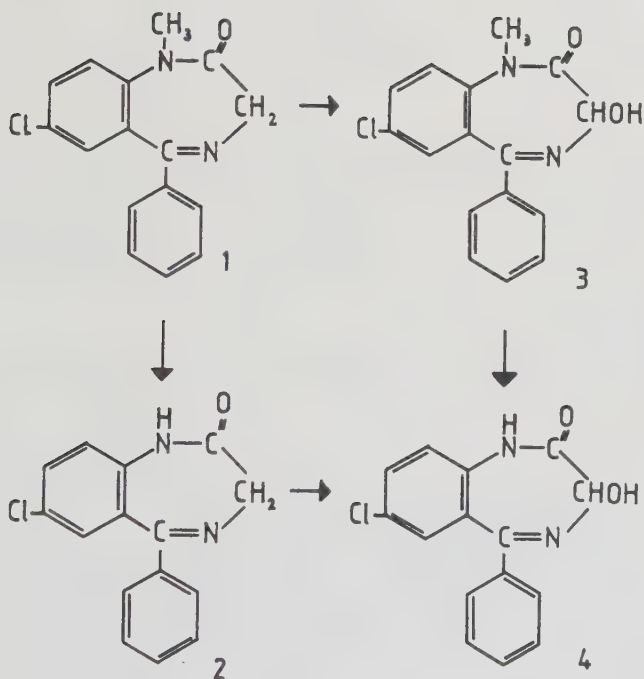
2.2. Biotransformation von Diazepam

Der Metabolismus von Diazepam bei Mensch, Hund und Ratte wurde von Schwartz et al. (1965) und von Ruelius et al. (1965) beschrieben. Danach kommt es in einem ersten Schritt zu einer Demethylierungsreaktion am N_1 -Atom zum N-Desmethyldiazepam (NDD) und nach Oxidation am C_3 -Atom zu Oxazepam (Abb. 1). Der Abbau von Diazepam zum 3-Hydroxydiazepam mit anschließender Demethylierung zu Oxazepam spielt beim Hund eine untergeordnete Rolle (Löscher und Frey 1981). Bei der Ratte kommt es zusätzlich zu Hydroxylierungen am 5-Phenylring zu 4-Hydroxydiazepam, 4-Hydroxy-N-Desmethyldiazepam und zu 4-Hydroxymethyloxazepam. Die Ausscheidung erfolgt vorwiegend in glucuronisierter Form der hydroxylierten Metaboliten. Die Biotransformation erfolgt hauptsächlich in den Lebermikrosomen (De Silva et al. 1966).

2.3. Pharmakokinetik von Diazepam

Nach intravenöser Gabe von Diazepam zeigen die Plasmakonzentrationen von unmetabolisiertem Diazepam beim Hund einen triexponentiellen Abfall und können durch ein offenes 3-Kompartiment Modell dargestellt werden (Kleijn et al. 1971, Löscher und Frey 1981). Die durchschnittlichen Eliminationshalbwertszeiten liegen nach Löscher und Frey (1981) bei 3,2 h, nach Klotz et al. (1976a) bei 7,6 h und nach van der Kleijn (1971) bei 9 h. Diazepam wird beim Hund sehr schnell zum Hauptmetaboliten N-Desmethyldiazepam abgebaut, dabei erreichen die Plasmakonzentrationen von NDD schon 30 min nach i.v. Injektion die Konzentrationen von Diazepam. Die Halbwertszeiten von NDD und Oxazepam liegen bei durchschnittlich 3,6 h bzw. 5,7 h.

Abb. 1: Biotransformation von Diazepam



1 : Diazepam

2 : N-Desmethyldiazepam

3 : 3-Hydroxydiazepam

4 : Oxazepam

Die Eliminationshalbwertszeiten von Diazepam beim Hund unterscheiden sich sehr deutlich von denen beim Menschen. Hier liegen die Werte bei Kindern um 18 h und beim Erwachsenen zwischen 1 und 3 Tagen (Morselli 1977, Bochner et al. 1978). Die Halbwertszeiten für NDD liegen zwischen 50 und 120 h (Mandelli 1978) und für Oxazepam zwischen 4 und 13 h (Bellantuono 1980).

Die Metaboliten von Diazepam zeigen ebenfalls eine pharmakologische Wirkung und werden daher als "aktive Metaboliten" bezeichnet.

Nach oraler Gabe von 2 mg/kg Diazepam beim Hund wurden maximale Konzentrationen für Diazepam nach 45 - 60 min erreicht. Sie waren sehr gering (80 - 90 ng/ml) und wurden schon innerhalb der ersten 15 min von den NDD-Plasmakonzentrationen überschritten. Die Bioverfügbarkeit wurde mit 74 - 100 % angegeben, wobei nur 1 - 2 % der Gesamtdosis als unmetabolisiertes Diazepam vorlagen (Löscher und Frey 1981).

Der Übertritt über die Blut/Hirnschranke wurde ebenfalls von Löscher und Frey (1981) untersucht. Hierbei wurden mit einer initialen Diazepam-Gabe und anschließender Diazepam-Infusion nach 6 min maximale Konzentrationen im Liquor gefunden. Die Diazepam-Konzentrationen in der Zerebrospinalflüssigkeit blieben im Gleichgewicht mit den Plasmakonzentrationen, bei einem Konzentrationsverhältnis zwischen Zerebrospinalflüssigkeit zu Plasma von $0,041 \pm 0,014$. Dieser Wert stand in Übereinstimmung mit dem nicht proteingebundenen Anteil von Diazepam im Plasma. Für NDD wurde ein Verhältnis von $0,042 \pm 0,008$ angegeben, bei einer Plasmaproteinbindung von $96 \pm 0,65$ %. Die Plasmaproteinbindung von Oxazepam lag bei einem Wert von $87 \pm 3,1$ %. 3-Hydroxydiazepam wurde weder im Plasma noch in der Zerebrospinalflüssigkeit gefunden.

Untersuchungen von Ramsay et al. (1979) zeigten, daß bei der Katze bereits nach 1 min maximale Gehirnkonzentrationen vorlagen, und daß 2 min nach einer intravenösen Injektion von 0,3 mg/kg Diazepam die Diazepam-Konzentrationen im Cortex die Plasmakonzentrationen überschritten haben. Sie erklärten das mit einer hohen Lipidlöslichkeit und mit einer hohen Proteinbindung von Diazepam. Aktive Metaboliten konnten sie in den ersten 30 min nach der Gabe von Diazepam nicht finden. Morselli et al. (1973) fanden 20 min nach Gabe von markiertem Diazepam bei Katzen nur geringe

Konzentrationen von NDD, allerdings konnte gezeigt werden, daß nach 4 Stunden immer noch eine NDD-Kumulation stattfand. Sie zeigten weiterhin, daß trotz des Vorhandenseins hoher NDD-Konzentrationen eine Unterdrückung der epileptogenen Aktivität nicht stattgefunden hat und leiteten daraus eine sehr geringe Wirkung von NDD ab. Eine weitere Untersuchung an Katzen zeigte ebenfalls eine Übereinstimmung der Plasma- und Gehirnkonzentrationen schon 2 min nach einmaliger intravenöser Gabe von 2 mg/kg Diazepam. Danach fielen die Diazepam-Serumkonzentrationen schneller als im Gehirn (Gastone et al. 1974).

Marcucci et al. (1968) zeigten eine Kumulation von NDD und Oxazepam im Mäusegehirn und schrieben die bei Mäusen lang anhaltende antikonvulsive Wirkung von Diazepam der Anwesenheit dieser aktiven Metaboliten zu. Dagegen konnten sie im Rattengehirn keine nennenswerten Konzentrationen an NDD und Oxazepam feststellen, woraus sie ableiteten, daß die kurz anhaltende antikonvulsive Wirkung bei der Ratte ausschließlich auf Diazepam zurückzuführen war (Marcucci et al. 1968).

2.4. Pharmakodynamik

Das Spektrum der antikonvulsiven Wirkung von Diazepam auf experimentell erzeugte Krämpfe bei Tieren wurde in einer Reihe von Veröffentlichungen beschrieben (Browne und Penry 1973, Mattson 1972, Swinyard und Castellion 1966). Swinyard und Castellion (1966) ermittelten bei ihrer Arbeit an Mäusen im Test mit maximalem Elektroschock und gegen PTZ-induzierte Krämpfe eine ED_{50} von 18,7 mg/kg bzw. 0,27 mg/kg.

Die folgende Zusammenfassung befaßt sich vorwiegend mit dem Wirkungsmechanismus von Diazepam und anderen Benzodiazepinen im Zusammenhang mit putativen Neurotransmittern. Im Vordergrund steht hierbei die γ -Aminobuttersäure (GABA).

GABA: (γ -Aminobuttersäure) ist wohl der wichtigste inhibitorische Transmitter im zentralen Nervensystem. Sowohl experimentelle, als auch klinische Arbeiten weisen in zunehmendem Maße auf eine mögliche Bedeutung dieses Neurotransmitters in der Pathogenese verschiedener Erkrankungen des ZNS hin. So zeigen Untersuchungen an epileptischen Patienten, daß in durch Biopsie gewonnenem Gehirnmateriale supernormale Konzentrationen von GABA im epileptischen Fokus und umgebenden Gewebe vorlagen (Selder et al. 1972).

Allerdings konnte eine spätere Untersuchung von Perry et al. (1975) diese Befunde nicht bestätigen. Eine Untersuchung der Aktivität von GAD (Glutamatdecarboxylase), einem GABA synthetisierenden Enzym, im temporalen Cortex einer großen Gruppe epileptischer Patienten zeigte, daß bei einem großen Teil der Epileptiker eine stark erniedrigte Aktivität im Focus vorlag und ferner die Anzahl GABAerger Rezeptoren im Vergleich zum umliegenden Gewebe vermindert war (Lloyd et al. 1981). Eine Degeneration cerebellärer Purkinje-Zellen, einem Zelltyp, der besonders hohe Konzentrationen von GABA enthält, wurde bei allen schweren Epilepsieformen gefunden (Salzman et al. 1978). Wood et al. (1979) und Manyan et al. (1980) fanden bei Patienten mit verschiedenen Epilepsieformen eine Erniedrigung der lumbalen Liquorkonzentration von GABA um etwa 40 % im Vergleich zu gesunden Freiwilligen. Dabei zeigten Patienten mit Grand mal und psychomotorischen Epilepsien die niedrigsten GABA-Konzentrationen. Ein ähnlich niedriger Gehalt an GABA wurde auch im Liquor von Kindern nach Fieberkrämpfen gezeigt (Löscher et al. 1981). Insgesamt kann also in zunehmendem Maße auf eine mögliche Bedeutung von GABA in der Pathogenese von Epilepsien und in der Regulation der Krampfbereitschaft hingewiesen werden. Auf die Beteiligung von GABA bei der Entstehung bzw. Symptomatik anderer ZNS-Erkrankungen, wie dem Morbus Parkinson, der Chorea Huntington und der Schizophrenie soll hierbei nicht eingegangen werden. Bei der Untersuchung der Wirkungsweisen von Benzodiazepinen wurde wiederholt ein Einfluß auf eine Reihe von putativen Neurotransmittern gezeigt.

So können Benzodiazepine, genauso wie Noradrenalin, den Umsatz von Dopamin im ZNS verringern. Weiterhin können Benzodiazepine dem durch Stress erzeugten Anstieg des Noradrenalin-Umsatzes entgegenwirken (Dolce und Kaemmerer 1967).

Die Abnahme des turnover von Katecholaminen nach Gabe von Benzodiazepinen wurde als Ergebnis eines verringerten Impulsflusses dopaminerger und noradrenerger Axone gesehen (Corrodi et al. 1967). Durch Fuxe et al. (1975) wurde angedeutet, daß die Änderung im Dopamin-turnover als sekundärer Wirkungsmechanismus betrachtet werden kann. Die Abnahme des Dopamin Umsatzes im Nucleus caudatus nach Diazepam konnte durch Bicucullin, einen spezifischen GABA-Rezeptorenblocker, vermindert werden.

Andere Versuche zeigten, daß die Benzodiazepin-induzierte Senkung im turnover von Katecholaminen nicht mit der antikonvulsiven Wirkung dieser Pharmaka in Verbindung stand (Doteuchi und Costa 1973). Wise et al. (1972) und Stein et al. (1975) beschrieben nach Benzodiazepin-Gabe eine Senkung des Serotonin-Umsatzes. Sie deuteten an, daß diese Eigenschaft mit der anxiolytischen Wirkungskomponente der Benzodiazepine in Verbindung stehen könnte. Allerdings zeigten die gleichen Autoren, daß durch Benzodiazepine erzeugte Verhaltensweisen durch Picrotoxin, einem GABA-Antagonisten, umgekehrt werden konnten (Stein et al. 1973). So wurde auch hier die Wirkung der Benzodiazepine auf Serotonin als sekundär betrachtet, während als primärer Wirkungsort das GABAerge System vermutet wurde.

Der Einfluß von Benzodiazepinen auf das Acetylcholin-System im Gehirn wurde ebenfalls untersucht.

Benzodiazepine antagonisierten die letalen Wirkungen mehrerer Acetylcholinesterase-Hemmer und verhinderten durch Pentetrazol hervorgerufene Krämpfe. Es wurde zuvor gezeigt, daß Pentetrazol einen Anstieg des Acetylcholin-turnover bewirkte (Consolo et al. 1975). Die gleichen Autoren zeigten weiterhin, daß Diazepam den Acetylcholin-Gehalt in Synaptosomen des cerebralen Rattencortex steigerte, ohne dabei den Cholingehalt zu beeinflussen. In der Untersuchung weiterer Gehirnregionen wurde gezeigt, daß Diazepam einen Anstieg der Acetylcholin-Konzentrationen im Corpus striatum, in den Hemisphären und im Hippocampus bei Ratten, Mäusen und Meerschweinchen bewirkte. Es wurde vermutet, daß eine Blockade der Acetylcholin-Freisetzung ursächlich dazu beiträgt.

Dagegen zeigten Zsilla et al. (1976), daß Diazepam den turnover von Acetylcholin in Cortex und Mittelhirn der Ratte senkte, und daß Diazepam andererseits keinen Einfluß auf den Acetylcholin-Stoffwechsel im Corpus striatum und Hippocampus hatte. Allerdings waren die Diazepam-Konzentrationen bei Zsilla et al. (1976) geringer als die bei den Versuchen von Consolo et al. (1975).

Die Ergebnisse von Krosggaard-Larsen et al. (1975) zeigten, daß Muscimol, ein spezifischer GABA-Rezeptor-Agonist, ebenfalls in den Acetylcholin-Stoffwechsel eingriff. Es wurden daraufhin Bedenken geäußert, inwieweit die Benzodiazepine einen direkten Einfluß auf das Acetylcholin-System haben.

Weiterhin zeigten Consolo et al. (1975), daß die antikonvulsive

Wirkung von Diazepam bei Mäusen über 20 h andauerte, während der Diazepam-Einfluß auf den Acetylcholin-Gehalt des Gehirns nur etwas weniger als 2 h anhielt. Daraus wurde eine eher sekundäre Wirkung der Benzodiazepine auf das Acetylcholin-System abgeleitet. Der Einfluß von Benzodiazepinen auf Glycin, einen inhibitorischen Transmitter im Gehirnstamm und im Rückenmark, und dessen Rezeptoren wurde in einer Reihe von Experimenten untersucht (Costa et al. 1975, Snyder und Enna 1975, Stein et al. 1975, Young et al. 1973). Aus den durchgeführten Untersuchungen konnten aber keine klärenden Aussagen über die Wechselwirkungen von Benzodiazepinen mit Glycin bzw. mit Glycin-Rezeptoren getroffen werden. Trotz der großen Anzahl von Neurotransmittern, die mit dem Wirkungsmechanismus der Benzodiazepine in Zusammenhang gesehen werden, zeigen die aufgeführten Beispiele eine entscheidende Beteiligung von GABA bei der Vermittlung der Benzodiazepin-Wirkungen, bei denen allerdings sekundär die Beteiligung anderer Neurotransmitter nicht ausgeschlossen werden kann.

Stoffe, die das GABAerge System im ZNS beeinflussen, können Krämpfe hervorrufen. Bicucullin und Picrotoxin sind bei allen Tierarten bekannte Konvulsiva. Durch GABA-Rezeptorenblocker hervorgerufene Krämpfe konnten entweder durch Benzodiazepine oder durch Amino-oxyessigsäure, einen Hemmstoff der GABA-T, dem geschwindigkeitsbestimmenden Abbauenzym von GABA, antagonisiert werden (Haefely et al. 1975). Die Blockade der GABA-Synthese führte zu Krämpfen, die durch lokale Applikationen von GABA gehemmt werden konnten (Baxter und Roberts 1960).

Benzodiazepin-Rezeptoren und ihr Zusammenhang mit dem GABAergen System:

Squires und Braestrup (1977) fanden bei ihren Versuchen mit Neurotransmittern, daß markiertes Diazepam (1,6 nM) spezifisch in verschiedenen Gehirnregionen der Ratte gebunden wurde. Hohe Bindungsanteile wurden im frontalen und occipitalen Cortex gefunden. Dagegen war die Bindung in Pons und Medulla nur gering. Keiner der verwendeten Neurotransmitter (Acetylcholin, Noradrenalin, Dopamin, Serotonin, GABA, L-Glutamat oder Glycin, alle 0,1 mM) oder ihrer Antagonisten (Phenoxybenzamin, Propranolol, Methysergid, Bicucullin, Picrotoxin oder Strychnin, alle 3×10^{-6} M) war in der Lage, markiertes Diazepam von seinem Bindungsort zu

verdrängen; aber 3 μ M Diazepam verdrängte 91 - 93 % des markierten Diazepams. Weiterhin testeten Squires und Braestrup 21 verschiedene Benzodiazepin-Derivate und zeigten, daß markiertes Diazepam von ihnen verdrängt wurde. Eine Beziehung zwischen der Verdrängungspotenz dieser Benzodiazepine und ihrer anxiolytischen Wirkungsstärke wurde gezeigt. Die Autoren postulierten, daß die pharmakologischen Wirkungen der Benzodiazepine im zentralen Nervensystem durch die Wechselwirkung mit spezifischen Rezeptoren im ZNS gesehen werden müssen. In einer anderen Untersuchung mit isolierten synaptosomalen Membranfraktionen des ZNS fanden Möhler und Okada (1977) ähnliche Ergebnisse. Diese Beobachtungen stehen nicht im Gegensatz zu dem oben beschriebenen Zusammenhang des GABAergen Systems mit der Wirkungsweise der Benzodiazepine. Toffano et al. (1978) zeigten in frisch präparierten Membranen des cerebralen Rattencortex, daß Diazepam die GABA-Bindungskapazität, oder anders ausgedrückt, die Zahl der Bindungsstellen von GABA gegenüber seinen spezifischen Rezeptoren, reduzierte, bei gleichzeitiger Affinitätserhöhung. Sie zeigten weiterhin, daß bei einer Vorbehandlung der Membranen mit geringen Diazepam-Konzentrationen eine signifikante Affinitätserhöhung von GABA gegenüber seinen Rezeptoren auftrat. Die maximale Bindungskapazität blieb dabei unbeeinflußt. Die Autoren postulierten, daß Benzodiazepine durch eine Verdrängung eines Inhibitors, der möglicherweise am GABA-Rezeptor lokalisiert ist, eine Affinitätserhöhung von GABA zu seinen Rezeptoren bewirken. Weitere Veröffentlichungen zeigen einen engen Zusammenhang von Benzodiazepin-Rezeptoren und GABA-Rezeptoren.

Costa (1979) beschrieb die Benzodiazepin-Rezeptoren als Teil einer "supramolekularen Funktionseinheit", bestehend aus GABA-Rezeptoren, dem GABA-Modulin, einer Proteinkinase und dem Chlorid-Jonophor. Danach sollen Benzodiazepine als kompetitive Antagonisten zum GABA-Modulin wirken, einem thermostabilen Membranprotein, das durch allosterische Wirkungsweise die Bindungsfähigkeit der GABA-Rezeptoren gegenüber GABA beeinflussen kann. Es soll also durch Benzodiazepine zu einer Erleichterung der Bindung von GABA zu seinem Rezeptor kommen. Costa stellte weiterhin fest, daß der Angriffspunkt der Benzodiazepine postsynaptisch lokalisiert sein muß, da präsynaptische Wirkungsorte zu einer Erhöhung im GABA-turnover führen müßten. Der GABA-Rezeptor in

der postsynaptischen Membran scheint in Form eines Komplexes mit den Chloridkanälen der Membran verbunden zu sein (Ticku und Olsen 1978). Dabei wird angenommen, daß sich an den Chlorid-Kanälen Membranproteine (Chlorid-Jonophore) befinden, die die Durchlässigkeit der Kanäle modulieren. Es kommt nach der Besetzung des GABA-Rezeptors durch GABA zu einer Erleichterung des Chlorid-Influsses und damit zu einer Hyperpolarisation der Neuronenmembran. Ähnliche Modellvorstellungen wurden von einer Reihe weiterer Autoren erwogen (Ehlert et al. 1981, Olsen 1981, Tallman et al. 1978).

Chiu und Rosenberg (1979) zeigten an gründlich gewaschenen Synaptosomen-Membranen des Rattencortex, daß bei kurzzeitiger GABA-Exposition die Diazepam-Bindungsaffinität durch GABA erhöht wurde. Bei höheren GABA-Konzentrationen konnte zusätzlich zur Affinitätsänderung eine Erhöhung der Zahl der Bindungsstellen für Diazepam nachgewiesen werden.

Shibla et al. (1981) behandelten Zellkulturen aus Gehirnen von Mäuseföten und adulten Mäusen mit $1 \mu\text{M}$ Diazepam. Nach 3 Wochen konnten sie bei Vergleich mit einer Kontrollkultur keine Änderung der Benzodiazepin-Rezeptoreigenschaften feststellen. Weiterhin wurden Zellkulturen nach einer 3 Wochen dauernden Anwesenheit von $1 \mu\text{M}$ GABA- oder Muscimol untersucht. Auch hierbei konnte keine Änderung der Bindungsaffinität und der Dichte der Rezeptoren gezeigt werden.

Weitere Untersuchungen, die einen Zusammenhang der Benzodiazepin-Rezeptoren mit den GABA-Rezeptoren bestätigen, wurden von Maggi et al. (1980), Unnerstall et al. (1981), Crawley et al. (1982) und Marangos und Crawley (1982) durchgeführt. Die beiden letzten Arbeitsgruppen beschrieben dabei einen reziproken Zusammenhang der Bindungskapazität (B_{max}) zwischen beiden Rezeptorenarten. Die Bindungsaffinität (K_D) beider Rezeptorenarten, im Kleinhirn und Vorderhirn bei Mäusen, wurde bei den Versuchen nicht signifikant beeinflusst.

Auf Grund der aufgeführten Untersuchungen scheint es wahrscheinlich, daß die antikonvulsive Wirkung der Benzodiazepine in engem Zusammenhang mit dem GABAergen System gesehen werden kann. Der molekulare Mechanismus blieb bis heute noch unklar.

2.5. Pentetrazol (PTZ)

Pentetrazol übt seine Wirkungen vorwiegend im zentralen Nervensystem aus und ist ein gebräuchlicher Stoff für das Screening antikonvulsiv wirksamer Verbindungen. Eine Vielzahl experimenteller Modelle wurde von Stone (1972) beschrieben.

Pentetrazol ist eine weiße, kristalline Substanz mit einem Schmelzpunkt von 57 - 60°C. Es ist gut in Wasser löslich und löst sich in den meisten organischen Lösungsmitteln.

PTZ wird unabhängig von der Applikationsart schnell resorbiert und verteilt sich im Gesamtkörperwasser (Esplin und Woodbury 1956, Vohland und Koransky 1972). Bindungen an Gewebekomponenten scheinen nicht vorzukommen. Eine Plasmaprotein-Bindung bis zu 9 % wurde beschrieben (Stewart und Story 1972).

Die Inaktivierung erfolgt bei der Ratte mit Hilfe mikrosomaler Leberenzyme in Anwesenheit von NADPH und Sauerstoff zu 5 Metaboliten, von denen 2 in hydroxylierter Form 70 % der gesamten Urinausscheidung ausmachen (Vohland und Koransky 1972). Die Halbwertszeit beträgt bei der Ratte 2,5 - 6 h (Esplin und Woodbury 1956, Rowles et al. 1971, Vohland und Koransky 1972) und beim Hund 1,2 h (Jun 1976).

Wirkungsmechanismus: Obwohl die Wirkungen von PTZ ausführlich erforscht wurden, blieben die Wirkungsmechanismen noch unbekannt und lediglich hypothetischer Natur.

Diskutiert werden:

1. Wirkungen an den Synapsen

Hinweise für eine direkte Wirkung von PTZ an GABA-Rezeptoren wurden von Macdonald und Barker (1977) gefunden. Sie sahen Teile der konvulsiven Aktivität von PTZ in der Fähigkeit, die GABA-vermittelte postsynaptische Hemmung im Säuger ZNS selektiv zu antagonisieren.

Syapin und Rickmann (1981) stellten nach der Behandlung von Mäusen mit subkonvulsiven PTZ-Dosen einen Anstieg der Benzodiazepin-Rezeptoren (B_{max}) im Vorderhirn fest und sahen darin einen direkten Angriffspunkt von PTZ an Benzodiazepin-Rezeptoren. Dieser Zusammenhang wurde in einer anderen Untersuchung bestätigt (Paul und Skolnick 1978). Die Autoren beschrieben einen 21,2 %igen Anstieg der Bindung von markiertem Diazepam an kortikalen Rattenmembranen nach PTZ-induzierten Krämpfen. Sie sahen den Anstieg der Bindung mehr in einer Änderung der Zahl

der Rezeptoren, als in einer Änderung der Affinität zu Benzodiazepin-Bindungsstellen.

Eine Wirkungsweise an der von GABA oder anderen Neurotransmittern induzierten Chlorid-Durchlässigkeit (fast inhibitory responses) stellten Pellmar und Wilson (1977) an Neuronen von *Aplysia californica* fest. Sie zeigten weiterhin, daß PTZ nur eine geringe Wirkung auf die Na-Durchlässigkeit (fast excitatory responses) und die K-Durchlässigkeit (slow inhibitory responses) besaß.

Wilson und Escueta (1974) sahen die synaptischen Wirkungen von PTZ in einer Abschwächung cholinergischer inhibitorischer postsynaptischer Potentiale ohne nennenswerten Einfluß auf excitatorische postsynaptische Potentiale derselben Neuronen.

2. Membranwirkungen

Die Beeinflussung von Membraneigenschaften durch PTZ wurde wiederholt von zahlreichen Autoren dargestellt (David et al. 1974, Ducreux et al. 1972, Faugier-Grimaud 1974, Faugier und Willows 1973, Klee et al. 1973, Speckmann und Caspers 1973, Williamson und Crill 1976a, Williamson und Crill 1976b). Im Vordergrund stehen hierbei Permeabilitätsveränderungen der Neuronenmembranen, die zu einer erhöhten Erregbarkeit führen.

3. Biochemische Wirkungen

Hinsichtlich der biochemischen Wirkungen von PTZ liegen sehr unterschiedliche Ergebnisse vor in Bezug auf Beeinflussungen von Enzymen des Ionentransportsystems an Neuronenoberflächen. So wurde von Woodbury (1980) eine Hemmung der Na-K-ATPase durch PTZ bei in vitro-Untersuchungen am cerebralen Rattencortex beschrieben. Woodbury deutete an, daß einige der excitatorischen PTZ-Wirkungen durch diesen Mechanismus erklärt werden könnten. Demgegenüber stellten Brown und Stone (1973) und Pincus und Giarman (1967) in ihren Untersuchungen weder eine Beeinflussung der Na-K-ATPase noch der Mg-ATPase fest.

Von anderen Autoren wurden sogar ansteigende Na-K-ATPase Aktivitäten nach PTZ beschrieben (De Robertis et al. 1969, Bignami et al. 1966). Weiterhin wurde über eine Abnahme der HCO_3 -ATPase Aktivität in Mitochondrien von Gliazellen im ZNS durch Pentetrazol berichtet. Der HCO_3 -ATPase kommt eine Bedeutung beim aktiven Chlorid-Transport in Gliazellen zu, und ihre Hemmung kann wieder im Zusammenhang mit einer Änderung der Chlorid-Durchlässigkeit

gesehen werden.

Die hier nur unvollständig aufgeführten Beispiele zeigen einen sehr vielfältigen Mechanismus von PTZ im zentralen Nervensystem, zeigen aber weiterhin Überschneidungen mit den diskutierten Wirkungsweisen der Benzodiazepine. Ein direkter Zusammenhang beider Wirkungsmechanismen wurde auch in einer neueren Veröffentlichung beschrieben (Rehavi et al. 1982). Danach bestand eine hochsignifikante Korrelation ($r=0,87$, $p < 0,01$) zwischen der konvulsiven Wirkungsstärke (in vivo) verschiedener Tetrazol-Derivate ($C_3 - C_{11}$) und ihrer Fähigkeit markiertes Diazepam von seinen Rezeptoren zu verdrängen (in vitro).

2.6. Toleranz

Unter Toleranz versteht man, daß bei regelmäßiger Zufuhr eines Pharmakons die Wirkung allmählich geringer wird, oder anders ausgedrückt, daß höhere Arzneimitteldosen notwendig sind, um die gewünschte therapeutische Wirkung aufrecht zu erhalten. Man kann hierbei zwischen 2 Arten der Toleranz unterscheiden: der metabolischen Toleranz und der funktionellen Toleranz. Die metabolische Toleranz hat ihre Ursache in einer gesteigerten metabolischen Inaktivierung, die zur Aufrechterhaltung therapeutisch wirksamer Arzneimittelkonzentrationen eine Dosishöherung notwendig macht. Die funktionelle Toleranz ist durch zentrale Adaptationsvorgänge charakterisiert, die zur Aufrechterhaltung der gewünschten therapeutischen Wirkung höhere Konzentrationen (Dosen) erfordert.

Das Phänomen der abnehmenden Arzneimittelwirksamkeit im Verlauf einer antiepileptischen Behandlung wurde von Browne (1976) beschrieben. Er führte als mögliche Ursachen dazu 6 Punkte auf: 1. Variabilität der Anfallshäufigkeit, 2. "non-compliance" (nicht zuverlässige Einnahme des Arzneimittels durch den Patienten), 3. Wachstum des Patienten (Gewichtszunahme bei gleichbleibender Dosis), 4. funktionelle Toleranz, 5. Enzyminduktion und 6. Metaboliten, die mit der antikonvulsiven Arzneimittelwirkung interferieren. Streng genommen haben die Punkte 1 - 3 nichts mit der Toleranz zu tun, können aber eine abnehmende Arzneimittelwirksamkeit vortäuschen. Diese Ursachen können aber durch die Bestimmung der Plasmakonzentrationen bzw. durch Anpassung der Dosierung an das Körpergewicht ausgeklammert werden.

Die Toleranzentwicklung gegen die antiepileptische Wirkung von Benzodiazepinen wurde oft beschrieben.

Browne und Penry (1973) faßten in einer Übersichtsarbeit über die Bedeutung der Benzodiazepine bei der Behandlung der Epilepsie 222 Fälle von Toleranzentwicklung gegenüber Diazepam, Nitrazepam oder Clonazepam aus 20 Veröffentlichungen zusammen. Die Medikamente wurden zur Behandlung des Petit Mal und gegen infantile oder andere myoklonische Anfälle eingesetzt. Eine Toleranz entwickelte sich innerhalb von wenigen Tagen bis zu Monaten der Behandlung in 8 - 52 % der Patienten. Die Frage nach der metabolischen oder funktionellen Ursache der Toleranz blieb offen. Nach den bisherigen Erfahrungen mit kleinen Dosen dieser Medikamente tritt der letztere Typ auf.

Die Toleranz gegen Diazepam erschien innerhalb weniger Wochen (Gastaut et al. 1967) oder innerhalb von 6 - 10 Monaten (Trolle 1965) bei bis zu 40 % der Patienten. Die Toleranz gegen die antiepileptische Wirkung von Nitrazepam entwickelte sich in einigen Fällen schon nach wenigen Tagen; in anderen nach Monaten der Behandlung (Jong 1964, Gibbs und Anderson 1965, Hagberg 1968, Lambert und Petersen 1970).

Millichap und Ortiz (1966) zeigten, daß bei 29 von 36 Patienten mit Myoklonien zur Erzielung einer Anfallsfreiheit eine Dosissteigerung von anfangs 0,1 - 0,7 mg/kg auf 0,3 - 4,0 mg/kg notwendig war. Bei dieser Untersuchung lag die durchschnittliche Zeit bis zum Auftreten einer Toleranz bei 12 Wochen. In einer Übersichtsarbeit über Clonazepam (Browne 1976) wurde eine Toleranzentwicklung der antiepileptischen Wirkung gegenüber verschiedenen Formen der Epilepsie bei 11 - 100 % der Patienten beschrieben. Bei einem Drittel der tolerant gewordenen Patienten konnte selbst nach Dosissteigerungen keine Anfallskontrolle erzielt werden. Das Auftreten der Toleranz konnte 1 - 6 Monate nach Behandlungsbeginn festgestellt werden. Ähnliche Ergebnisse werden von weiteren Autoren berichtet (Bergamini et al. 1970, Dumermuth und Kovacs 1974, Kick und Dreyer 1973, Masland 1975). Kruse und Blankenhorn (1973) beschrieben in ihrem zusammenfassenden Erfahrungsbericht einen progressiven Verlust der antiepileptischen Wirkung von Clonazepam. Sie zeigten bei verschiedenen Formen kleiner epileptischer Anfälle einen Abfall der positiven Wirkung (vollständige Anfallsfreiheit oder mindestens eine

50 %ige Reduktion) von 62 % im ersten Monat über 34 % nach 6 Monaten zu einem Wert von 14 % nach 2,5 Jahren. Für die Behandlung von myoklonisch-astatischen Anfällen wurden ähnliche Werte angegeben.

Dagegen traten beim Grand Mal und/oder bei tonischen Anfällen nur in einem geringeren Prozentsatz Besserungen auf. Bei diesen Anfallstypen wurde anfangs nur bei 41 % der Patienten eine ausreichende Clonazepam-Wirkung erzielt. Schon nach 6 - 12 Monaten war eine völlige Wirkungslosigkeit zu beobachten, die auch durch höhere Dosen nicht zu beseitigen war. Rossi et al. (1973) stellten bei Patienten mit generalisierter Epilepsie schon nach einer Behandlungswoche mit Clonazepam einen beginnenden Wirkungsverlust fest, der schon nach 1 Monat vollständig war.

Metabolische Toleranz

Die metabolische Toleranz scheint bei der Toleranzentwicklung der Benzodiazepine eine untergeordnete Rolle zu spielen und sollte bei den normalerweise geringen Dosen bei der epileptischen Therapie nicht vorkommen (Klotz et al. 1976b, Greenblatt und Shader 1978).

Dennoch sind die Aussagen hinsichtlich einer Enzyminduktion bei Diazepam-Behandlung kontrovers. Sellman et al. (1975) untersuchten den Metabolismus von Diazepam bei 7 psychiatrischen Patienten. Diese wurden über einen Zeitraum von bis zu 5 Jahren mit täglichen Diazepam-Gaben von 10 - 30 mg behandelt. Nach dem Absetzen von Diazepam und anschließender 1-tägiger Pause wurde den Patienten erneut 10 mg Diazepam i.v. verabreicht. Dabei zeigte sich ein beschleunigter Diazepam-Abbau gegenüber gesunden Personen einer Kontrollgruppe. Die Patienten zeigten weiterhin eine beträchtlich höhere NDD-Plasmakonzentration. Zu einem ähnlichen Ergebnis kamen Kanto et al. (1974) bei ihren Untersuchungen an Patienten mit Angst-Neurosen. Sie führten folgende 4 Punkte für die Annahme einer Enzyminduktion auf: 1. Abnahme der Diazepam- und NDD-Konzentrationen im Plasma nach 1 - 6 Wochen Therapiedauer, 2. verhältnismäßig niedrige Diazepam-Plasmakonzentrationen bei Patienten, die Diazepam über mehrere Monate oder Jahre genommen hatten, 3. viel höhere NDD-Konzentrationen bei i.v. Gabe von Diazepam nach chronischem Diazepam-Mißbrauch und 4. konnte nach einer gewissen Abstinenzzeit und anschließender i.v. Diaze-

pam-Gabe ein langsamerer Abbau von Diazepam zu NDD festgestellt werden. Kanto et al. schlossen aber zusätzlich zur metabolischen eine funktionelle Toleranz nicht aus.

Zu gegensätzlichen Ergebnissen kamen Klotz et al. in ihren 1976(a) und 1981 durchgeführten Untersuchungen an Probanden, Hunden und Kaninchen. Sie zeigten bei allen Species eine signifikante Reduzierung der Eliminationshalbwertszeit. Sie folgerten daraus, daß hohe NDD-Konzentrationen durch Produktinhibition die enzymatische Umwandlung von Diazepam zu NDD beeinflussen.

Funktionelle Toleranz

Erste experimentelle Untersuchungen zum Nachweis einer funktionellen Toleranz führten Killam et al. (1973) durch. Bei ihrer Arbeit an Affen zeigten sie eine Abnahme der antikonvulsiven Wirkungskomponente von Diazepam und Clonazepam und beschrieben weiterhin, daß zur Anfallskontrolle mit Diazepam eine 8 - 16 fache Dosiserhöhung und mit Clonazepam eine 4fache Dosissteigerung im Verlauf der 2 - 4 monatigen Behandlung notwendig war. Bei Versuchen mit Mäusen, denen täglich 10 mg/kg Diazepam i.p. verabreicht wurden, stellten Fuxe et al. (1975) nach dem 5. Behandlungstag eine Toleranzentwicklung gegen durch PTZ hervorgerufene Krämpfe bei 30 - 40 % der Tiere fest. Bei einer ähnlichen experimentellen Arbeit wurde eine signifikante Toleranzentwicklung ($p < 0,01$) für Diazepam (4 mg/kg i.p.) gegenüber PTZ-induzierten Krämpfen ab dem 5. Behandlungstag beschrieben (File und Mabbitt 1983). Gegensätzliche Ergebnisse wurden in zwei weiteren Arbeiten gefunden. Juhász und Dairman (1977) konnten bei mit 2 mg/kg Diazepam oral behandelten Mäusen nach 4 Tagen noch keine Toleranzentwicklung gegen PTZ feststellen. Bei gleicher Behandlungsweise konnte aber eine Toleranz der antikonvulsiven Wirkung von Diazepam gegenüber Bicucullin gesehen werden. Entsprechende Ergebnisse wurden auch von Lipka und Segar (1977) veröffentlicht. In jüngster Zeit wurden Änderungen von Benzodiazepin-Rezeptoreigenschaften nachgewiesen, die mit dem Entstehen der funktionellen Toleranz in Zusammenhang gebracht werden. So wurden in Arbeiten von Chiu und Rosenberg (1978) und Rosenberg und Chiu (1981) Änderungen der maximalen Bindungskapazität (B_{max}) für Benzodiazepine nachgewiesen. Hierbei wurden Ratten mit extrem hohen Flursazepam-Dosen (max. 150 mg/kg d)

behandelt. Die Reduzierung der Bindungskapazität lag zwischen 15 - 20 %, ging aber innerhalb 24 h nach Behandlungsende auf ihren Ausgangswert zurück. Bei einer weiteren Untersuchung der gleichen Autoren (Posenberg und Chiu 1982) an Katzen war nach 5 Wochen Behandlungsdauer mit Flurazepam eine 10fache Dosiserhöhung zur Erzielung der gleichen Wirkung wie bei einer Kontrollgruppe notwendig. Auch hier wurden als Ursache der funktionellen Toleranz Änderungen der Benzodiazepin-Rezeptoreigenschaften gesehen. Möhler et al. (1978) konnten bei ihren Versuchen mit Ratten mit 3 mg/kg Diazepam i.p. keine Änderung der Benzodiazepin-Rezeptoreigenschaften finden und sahen darin eine Übereinstimmung mit der ihrer Meinung nach fehlenden Toleranz während einer Benzodiazepin-Therapie. Eine gleichzeitig im Corpus striatum stattfindende Abnahme der GABA-Bindungsstellen blieb in ihrer Bedeutung unklar.

Bei Untersuchungen an Ratten mit 90 mg/kg/d Diazepam über einen Zeitraum von 8 Wochen konnte weder eine Änderung der Bindungsaffinität, noch der maximalen Bindungskapazität der Benzodiazepin-Rezeptoren festgestellt werden (Braestrup et al. 1979). Der Zeitpunkt der in vitro Untersuchung erscheint allerdings mit 5 und 11 Tagen nach Behandlungsende zu spät. In einer anderen Studie mit konträrem Ergebnis wurden Ratten ebenfalls mit hohen Diazepam-Dosen behandelt. Nach der 35tägigen Behandlung war ein Anstieg der Rezeptorbindung von markiertem Diazepam festzustellen. Offen blieb die Frage, ob eine Änderung der Bindungskapazität oder der -affinität stattgefunden hat (Distefano et al. 1979).

Die bereits erwähnte Arbeit von Crawley et al. (1982) zeigte eine Abnahme der Bindungsstellen in Abhängigkeit von der Wirkungsstärke der verwendeten Benzodiazepine. Diese Abnahme war bei Clonazepam stärker ausgeprägt und hielt länger an als bei Chlordiazepoxid. In einer neueren Untersuchung wurden Kulturen des cerebralen Cortex von Mäuseföten und adulten Mäusen im chronischen Versuch mit Diazepam behandelt (Sher 1983). Die Ergebnisse zeigten eine signifikante Verringerung der Benzodiazepin-Bindung nach chronischer Exposition gegenüber klinisch relevanten Konzentrationen (0,45 - 3,6 µg/ml) des Medikamentes. Weiterhin konnte eine Reduktion des neuronalen Anteils der Rezeptoren nach akuter und chronischer Exposition gezeigt werden,

wobei die Veränderungen an den Benzodiazepin-Rezeptoren nach der Exposition unterschiedlich lange anhielten. Die Autorin sah in dem letzten Befund eine Erklärung für die klinischen Manifestationen der Toleranz und die reduzierte antikonvulsive Wirkung nach länger dauernder Verwendung von Benzodiazepinen. Elsass et al. (1980) sahen in der Verdrängung von Diazepam durch schwächer sedativ wirksames NDD vom Rezeptor die Ursache der raschen Toleranz gegen die sedative Wirkung von Diazepam. Eine anschließend zum Tragen kommende anxiolytische Wirkung führten sie auf die Besetzung der Rezeptoren durch das gleich stark anxiolytisch wirkende NDD zurück. Hierbei konnten sie keine Toleranzentwicklung feststellen. Möglicherweise kann auch die Toleranz gegen die antikonvulsive Wirkungsweise von Diazepam durch diesen Verdrängungsmechanismus erklärt werden.

Akute Toleranz

Unter der akuten Toleranz versteht man die Entwicklung einer Empfindlichkeitsabnahme, die sich innerhalb von Minuten bis Stunden einstellen kann. Mit anderen Worten ausgedrückt; die Arzneimittelwirkung zeigt sich am Ende erst bei höheren Konzentrationen als zu Beginn der Behandlung.

Parsonage und Norris (1967) beschrieben dieses Phänomen bei der Diazepam-Behandlung von Patienten mit schwerem Status epilepticus. Die Toleranz entwickelte sich im Verlauf einer intravenösen Infusion bei Gesamtdosen von 300 - 500 mg über 2 - 3 Tage. Ein Wirkungsverlust zeigte sich innerhalb der ersten 24 h und konnte auch durch intermittierende Diazepam-Injektionen nicht beseitigt werden. Experimentelle Versuche zum Nachweis einer akuten Toleranz wurden durch Sharer und Kutt (1971) an Katzen durchgeführt; focale Anfälle wurden durch intracortikale Penicillin-Gaben ausgelöst. Die Muskelkrämpfe konnten durch eine Infusion von 0,5 mg/kg Diazepam über 2 min für einen Zeitraum von 3 - 90 min aufgehoben werden. Beim Wiederauftreten der Krämpfe war durchschnittlich eine 3,5fache Erhöhung der Diazepam-Dosis notwendig, um erneut Krampffreiheit zu erzielen. Die Autoren sahen die Ursache nicht in einer schnellen metabolischen Umwandlung, da Diazepam langsam verstoffwechselt wird und die Metaboliten ebenfalls pharmakologische Wirkungen zeigen. Bei weiteren Arbeiten mit Katzen wurden durch Barnett und Fiore

(1971, 1973) die antagonistischen Wirkungen von Diazepam auf den Lingomandibular-Reflex, den Flexor-Reflex und die depressive Wirkung auf EEG-Amplituden untersucht. Die Toleranz stellte sich ein, als ansteigende Diazepam-Dosen in Intervallen von mehr als 15 min intravenös injiziert wurden und zeigte sich nach intraduodenaler Gabe verstärkt. Eine Abschwächung der Diazepam-Wirkung war nach vorangehender Gabe von NDD festzustellen. Die Wirkungsstärke des Hauptmetaboliten NDD wurde mit einem Fünftel der Diazepam-Wirkung angegeben. Weiterhin konnte keine Toleranz bei ausschließlicher NDD-Behandlung festgestellt werden. Als Ursache der Toleranz wurde die Verdrängung von Diazepam durch kumulierendes NDD am Benzodiazepin-Rezeptor angesehen, das so die stärkere Wirkung von Diazepam verhindert. Möglicherweise liegt hierin auch die Ursache der akuten Toleranz gegenüber der antikonvulsiven Wirkung von Diazepam.

3. EIGENE UNTERSUCHUNGEN

3.1. Methodik

3.1.1. Tiermaterial

Die Versuche wurden an 20 klinisch gesunden Hunden unterschiedlicher Rassen, beiderlei Geschlechts, durchgeführt, Das Alter der Tiere lag zwischen 1 und 6 Jahren; das Gewicht zwischen 8 und 28 kg. In den 14 Tagen vor den Versuchen wurden den Tieren keine Arzneimittel verabreicht.

3.1.2. Verwendete Substanzen

Substanz	Hersteller bzw. Bezugsquelle
Diazepam (Valium ^R)	Hoffmann La Roche AG, Grenzach- Wyhlen
Dikaliumchlorazepat (Tranxilium ^R)	Heinrich Mack, Nachf. Illertis- sen
Heparin-Na	Leo-Pharmaceutical Prod., Bal- lerup, Dänemark
Ketamin-Hydrochlorid (Ketavet ^R)	Parke-Davis, München
Methyl-Propyl-Succini- mid (MPS)	Desitin-Werke Karl Klinke, Ham- burg
N-Desmethyldiazepam (NDD)	Hoffmann La Roche AG, Grenzach- Wyhlen
Pentetrazol (PTZ)	Knoll AG, Ludwigshafen
Piritramid (Dipidolor ^R)	Janssen GmbH, Düsseldorf
Propionyl-Promazin (Combelen ^R)	Bayer AG, Leverkusen
Succinylcholin (Succinyl- Asta ^R)	Asta-Werke, Brackwede
Xylazin (Rompun ^R)	Bayer AG, Leverkusen

Alle verwendeten Reagenzien waren analysenreine Substanzen der Firma E. Merck, Darmstadt.

3.1.3. Versuche zum Nachweis der Toleranz bei subakuter Behandlungsweise

Für den Nachweis der Toleranz bei subakuter Behandlungsweise wurden 4 Versuchsreihen aufgestellt (Abb. 2). Die Hunde wurden den Behandlungen zufällig zugeordnet.

Abb. 2: Darstellung der 4 Versuchsreihen bei subakuter Behandlung.

		Behandlungstage					
		1.	8. ²⁾	9.-14.	15. ²⁾	16.-21.	22.
		K.S.B. ₁₎	K.S.B. ₂		K.S.B. ₃		K.S.B. ₄
Diazepam n = 3		0,25 mg/kg iv. 3x 0,25 mg/kg oral 0,25 mg/kg iv. 3x 0,25 mg/kg oral 0,25 mg/kg iv.					
Diazepam n = 4		0,5 mg/kg iv. 3x 0,5 mg/kg oral 0,5 mg/kg iv.					
Diazepam/ Chlorazepat n = 4		0,5 mg/kg iv.		3x 1 mg/kg oral		0,5 mg/kg iv.	
NDD / Chlorazepat n = 3		2 mg/kg iv.		3x 2 mg/kg oral		2 mg/kg iv. 3x 2 mg/kg oral	

1) K.S.B.: Krampfschwellen-Bestimmung

2) Zwei zusätzlich durchgeführte orale Behandlungen am 8. Tag (16⁰⁰, 24⁰⁰ Uhr) und am 15. Tag, sofern bis zum 22. Tag weiterbehandelt wurde, sind aus Übersichtsgründen nicht mit angegeben.

3.1.3.1. Bestimmung der Krampfschwellen

Die Krampfschwellen wurden am 1., 8. und am 15. Tag bestimmt. Sofern nach dem 15. Tag eine weitere Woche behandelt wurde,

erfolgte am 22. Tag eine erneute Bestimmung der Krampfschwelle. Zur Krampfauslösung wurde Pentetrazol verwendet. Die Konzentration der wässrigen PTZ-Lösung wurde so eingestellt, daß den Hunden ca. 10 mg/kg/min infundiert wurde. Die Applikation erfolgte mittels einer Infusionspumpe (Modell 351, SAGE-Instruments Inc. N.Y. White Plains, USA) über einen etwa 1 m langen PVC-Schlauch in die linke V. cephalica antibrachii. Das Infusionsvolumen betrug 3 ml/min. Beim Auftreten der ersten deutlichen generalisierten Zuckung (initialer Klonus) wurde die Infusion gestoppt. Oft folgte auf den initialen Klonus ein tonisch-klonischer Krampf mit Verlust der Stellreflexe. Die Latenz zwischen beiden Phasen betrug 5 - 20 sec. Teilweise gingen beide Phasen auch ohne Latenz ineinander über.

Bei den ersten fünf Bestimmungen der Krampfschwellen wurden mit Hilfe von Steckelektroden Elektroenzephalogramme aufgenommen. Da Krampfpotentiale praktisch erst mit der ersten generalisierten Zuckung zusammen beobachtet werden konnten, wurde in den späteren Versuchen auf das EEG verzichtet.

3.1.3.2. Berechnung des Krampfschwellen-Wertes

Aus der Zeit vom Infusionsbeginn bis zum Auftreten des initialen Klonus wurde der Gesamtverbrauch an PTZ (mg) berechnet und ins Verhältnis zum Körpergewicht gesetzt.

Nach der Bestimmung der Krampfschwelle am 1. Tag wurden die Hunde bis zum 8. Tag keiner weiteren Behandlung unterzogen.

3.1.3.3. Behandlung mit 0,25 mg/kg Diazepam

Diese Untersuchung wurde bei 3 Hunden durchgeführt. Die Tiere wurden dazu in Brust-Bauchlage auf den Versuchstisch gebracht. Eine erste Blutprobe erfolgte aus der rechten V. cephalica antibrachii. Sofort daran anschließend wurde an gleicher Stelle die Injektion von 0,25 mg/kg Diazepam über einen Zeitraum von 10 sec vorgenommen. 13 min nach Injektionsbeginn wurde eine 2. Blutprobe aus der linken V. saphena entnommen. Genau 15 min nach der Diazepaminjektion erfolgte die Bestimmung der Krampfschwelle mit Hilfe einer PTZ-Infusion. Nach Krampfende wurde eine 3. Blutprobe aus der rechten V. saphena entnommen. Aus den Blutproben 2 und 3 wurde nach Bestimmung der Plasmakonzentrationen von Diazepam und seinen Metaboliten der 15min-Wert, d.h. der

Wert zu Beginn der Krampfschwellen-Bestimmung interpoliert. Am gleichen Tag wurde um 16⁰⁰ und 24⁰⁰ Uhr 0,25 mg/kg Diazepam oral verabreicht. Vom 9. - 14. Tag wurde mit 3 mal täglich 0,25 mg/kg Diazepam oral weiterbehandelt. Für die orale Gabe wurde die entsprechende Menge an Valium^R-Tabletten in eine Gelatine-Kapsel verbracht.

Am 15. Tag (8⁰⁰ Uhr) wurde erneut 0,25 mg/kg Diazepam i.v. injiziert und 15 min danach die Bestimmung der Krampfschwelle durchgeführt. Die Zeitpunkte und die Orte der Blut-Entnahmen entsprachen denen des 8. Tages. Bei einem Hund dieser Versuchsreihe wurde die orale Behandlung um eine weitere Woche verlängert und am 22. Tag nach erneuter Injektion von 0,25 mg/kg Diazepam (i.v.) die Krampfschwelle bestimmt.

3.1.3.4. Behandlung mit 0,5 mg/kg Diazepam

Diese Behandlung wurde bei 4 Hunden durchgeführt. Der Ablauf entsprach im Wesentlichen der Behandlung mit 0,25 mg/kg Diazepam. Die 2. Blutprobe erfolgte 8 min nach der Injektion von Diazepam (0,5 mg/kg i.v.). Die Bestimmung der Krampfschwellen wurde bei diesen Versuchen schon 10 min nach der intravenösen Diazepam-Gabe durchgeführt. Nach Krampfende wurde die 3. Blutprobe entnommen. Entsprechend wurden die Plasmakonzentrationen auf den 10min-Wert interpoliert.

3.1.3.5. Diazepam/Chlorazepat Behandlung

Bei dieser an 4 Hunden durchgeführten Behandlung sollte der Einfluß hoher NDD-Konzentrationen auf die Toleranz-Entwicklung festgestellt werden. Am 8. und 15. Tag erfolgte 15 min vor der Ermittlung der Krampfschwelle jeweils eine intravenöse Gabe von 0,5 mg/kg Diazepam. Die orale Behandlung wurde mit 3 x tgl. 1 mg/kg Dikaliumchlorazepat durchgeführt. Chlorazepat wird im Magen decarboxiliert und quantitativ als N-Desmethyldiazepam resorbiert (Wilensky et al. 1978).

3.1.3.6. NDD/Chlorazepat Behandlung

Diese Untersuchung wurde an 3 Hunden vorgenommen. Zwei der Tiere wurden bis zum 22. Tag weiterbehandelt. Die Krampfschwellen wurden 10 min nach Beginn der intravenösen NDD-Gaben ermittelt. Die frisch hergestellte 1 % ige NDD-Lösung wurde mittels In-

fusionspumpe über einen Zeitraum von 1 min verabreicht. Die Chlorazepat-Dosierung lag bei 3 x tgl. 2 mg/kg (oral).

3.1.3.6.1. Herstellung der NDD-Lösung (1 ‰)

Zu je 10 mg NDD-Trockensubstanz wurden 1 - 1,5 ml 1N HCl zugegeben und in einem Becherglas mit Magnetrührer kurz erhitzt. Nach dem Erkalten der Lösung wurde mit 0,33M Phosphatpuffer-Lösung (pH: 7,25) der pH-Wert zwischen 1,9 und 2,1 eingestellt. Nach quantitativem Überführen in einen Meßkolben wurde mit Aqua bidest. auf die entsprechende Menge verdünnt.

3.1.4. Versuche zum Nachweis der akuten Toleranz

3.1.4.1. Versuchsvorbereitungen

3.1.4.1.1. Elektrodenimplantation

1 - 2 Tage vor dem eigentlichen Versuch wurden den Hunden 4 Elektroden zur EEG-Abnahme implantiert.

Elektrodenbeschreibung:

Schraubelektroden: Als Schraubelektroden wurden V4A Kortikalis-schrauben mit 3,5 mm Außendurchmesser und einer Länge von

13 - 17 mm verwendet. An der Spitze wurden 3,5 Gewindegänge belassen, die restlichen wurden auf 2 mm Kerndurchmesser abgedreht. Für die Befestigung des Ableitkabels wurde die Schraube im Innensechskantkopf (2,5 mm) mit einer 0,8 mm Bohrung, 10 mm lang, versehen.



Plattenelektroden: Die Fußplatte bestand aus V4A Stahl mit einem Durchmesser von 6 mm und einer Plattendicke

von 0,5 mm. Als Mittelstück wurde ein mit PVC isoliertes, flexibles Drahtseil (V2A), Länge 17 - 24 mm, Durchmesser 0,8 mm verwendet, das beidseitig verkerbt wurde. Das Kopfstück hatte eine Länge von 8 mm und eine Dicke von 2 mm. Auf die Kopfstücke der Plattenelektroden wurden die Kappen des Ableitkabels aufgesteckt.

Operationsbeschreibung

Nach der intravenösen Injektion von Ketamin-Hydrochlorid (10 mg/kg) und Xylazin (2 mg/kg) in einer Mischspritze wurden die Haare im Operationsbereich entfernt und die Haut anschließend gründlich mit Jodtinktur desinfiziert. Fingerbreit caudal des Processus zygomaticus des Os frontale wurde mit einem 3 cm langen Schnitt, senkrecht zur Medianen, die Haut und das darunterliegende Fasciengewebe durchtrennt. Nach Entfernung des Periostes wurde mit einem Knochenbohrer ($\varnothing$: 2 mm) direkt auf der Linea temporalis beidseits der Medianen je ein Loch in die Lamina externa des Sinus frontalis gebohrt. Anschließend wurden die beiden Schraubelektroden mit 3 Windungsgängen fixiert und die Hautwundränder danach mit 4 Einzelheften (Seide gefl., Nr. 1) adaptiert.

Zur Implantation der Plattenelektroden wurde fingerbreit rostral der Linea nuchalis sup. ein dazu paralleler, beidseits der Medianen je 1,5 - 2,0 cm langer, durchgehender Hautschnitt angelegt. Die darunterliegende Temporalismuskulatur wurde auf beiden Seiten mit Hilfe einer Metzenbaum-Schere stumpf in Faserrichtung durchtrennt. Die beiden Plattenelektroden wurden auf das Periost der darunterliegenden Oss. parietales in ca. 1,2 - 1,5 cm Abstand zur Crista sagittalis ext. gesetzt. Die Fixierung der Elektroden erfolgte durch je 3 Einzelhefte um die Wundränder der zuvor durchtrennten Temporalismuskulatur mit Catgut Nr. 00. Anschließend wurde die Haut mit 5 - 6 Einzelheften zusammenge-näht (Seide gefl., Nr. 1). Die Anordnung der Elektroden ist in Abb. 3 dargestellt.

3.1.4.1.2. Versuchsvorbereitungen am Versuchstag

Am Versuchstag bekamen die Hunde eine Neuroleptanalgesie, d.h. die Kombination eines Neuroleptikums mit einem starken Analgetikum. Dazu wurden Propionyl-Promazin (0,3 mg/kg) und Piritramid (3,0 mg/kg) verwendet.

Anschließend wurde ein Endotrachealtubus eingeführt und die Tiere in die rechte Seitenlage gebracht. Nach der Einführung eines PVC-Katheters in die linke V. saphena wurden die Hunde mit 0,1 mg/kg Succinylcholin (Beagle: 0,2 mg/kg) vollständig relaxiert. Zur Aufrechterhaltung der Relaxation wurde während

des gesamten Versuchverlaufs 0,01 mg/kg/min Succinylcholin infundiert (Frey 1972). Das 1 %ige Succinylcholin wurde zur Einstellung der erforderlichen Konzentration mit 0,9 % NaCl-Lösung verdünnt. Das Infusionsvolumen betrug 6 ml/h (syringe pump, Modell 352, SAGE-Instruments Inc.).

Die Beatmung wurde mit einem Beatmungsgerät (Assistor 641, Drägerwerk, Lübeck) bei einer Frequenz von 10 - 12/min und einem maximalen Inspirationsdruck von 18 cm H₂O durchgeführt. Das Atemzugvolumen lag zwischen 20 und 25 ml/kg Körpergewicht. Es erfolgte die Einführung weiterer PVC-Katheter in die rechte V. femoralis zur Pentetrazol-Infusion, in die linke V. cephalica antibrachii zur Gabe von Diazepam bzw. NDD, in die linke V. jugularis zur Blutentnahme und in die linke A. carotis communis zur Blutdruckmessung. Der Carotis-Katheter wurde mit einer 0,075 %igen Heparin-Natrium Lösung (109,8 IU/ml in 0,9 % NaCl-Lösung) gefüllt. Die Messung des arteriellen Blutdruckes wurde mit einem STATHAM-Druckumwandler P23AA vorgenommen. Die Aufzeichnung erfolgte mit einem Lichtpunkt-Mehrkanalschreiber (ABEM-Ultralette 5651, Svenska Diamantbergborrnings AG, Stockholm, Schweden). Die rektale Körpertemperatur und die Raumtemperatur wurden fortlaufend mit einem elektronischen Universalthermometer (Typ TE 3, Ellab-Instruments, Kopenhagen, Dänemark) gemessen und halbstündlich protokolliert. Die Raumtemperatur wurde in Abhängigkeit von der Körpertemperatur der Hunde zwischen 20 und 30°C gehalten. Nach der Befestigung der Ableitkabel an den 4 EEG-Elektroden und anschließender Fixierung der Erdelektrode (subcutan) wurde das EEG-Gerät eingeschaltet (Rectilinear Thermalwriting Oscillograph 8K20 Series, San-ei Sokki, San-ei-Instrument Co, LTD Tokio, Japan). Es wurde bipolar nach der in Abb. 4 dargestellten Anordnung abgeleitet. Die Ableitung K₃ wurde nicht abgenommen, da auf dem 3. Kanal das EKG mitgeschrieben wurde. Zur Auswertung gelangten die beiden Diagonal-Ableitungen (K₅, K₆), die zur Erleichterung der Auswertung mit unterschiedlichen Empfindlichkeiten aufgenommen wurden.

Abb. 3: Elektrodenanordnung zur Ableitung des EEG

- 5 : Sitz der Erdelektrode
- 1,2: Schraubelektroden
- 3,4: Plattenelektroden

Abb. 4: Ableitprogramm

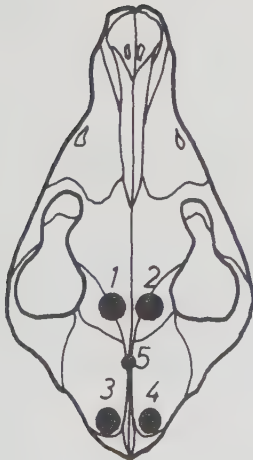


Abb. 3

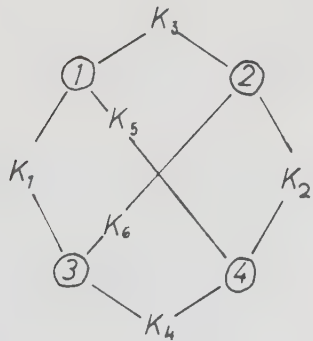


Abb. 4

Liquorentnahme

Bei 2 Hunden erfolgte die Entnahme von Liquorproben, um einen Vergleich der PTZ-Plasmakonzentrationen mit den Konzentrationen im Liquor durchführen zu können. Dazu wurde mit einer Becton-Dickinson-Liquorkanüle, gekürzt auf 35 mm, zwischen Cranium und 1. Halswirbel eingegangen und die Kanüle bis zum Subarachnoidalraum vorgeschoben. Nach der Entfernung des Mandrins wurde 1 ml Liquor je Probe entnommen.

3.1.4.2. Versuchsdurchführung

Mit dem eigentlichen Versuch wurde 20 min nach Beendigung der Präparation begonnen. Zur Auslösung von Krampfpotentialen wurde Pentetrazol verwendet. Es wurde versucht mit Pentetrazol einen steady-state einzustellen, mit der Absicht, charakteristische und konstante Veränderungen auf dem EEG zu erreichen, auf deren Grundlage die Wirkung von Diazepam bzw. NDD ausgewertet werden konnte. Es wurden 6 Versuche zum Nachweis der akuten Toleranz gegenüber Diazepam durchgeführt. Die Zeitabstände zwischen den einzelnen Diazepam-Gaben in den jeweiligen Versuchen betrugen 40 bzw. 60 min. Die einzelnen Diazepam-Gaben wurden über einen Zeitraum von 10 sec verabreicht.

Mit NDD wurden 3 Versuche durchgeführt. Die Zeitabstände zwischen den NDD-Applikationen der einzelnen Versuche betrugen 60, 90 bzw. 120 min. Die NDD-Lösung (1 %) wurde über einen Zeitraum von 1 min über den Cephalica-Katheter injiziert.

Berechnung der Bolusdosis und Infusionsgeschwindigkeit für PTZ

Die Berechnung des Bolus und der Infusionsgeschwindigkeit zur Erzielung eines steady-state wurde nach Mitenko und Ogilvie (1972) vorgenommen. Danach berechnete sich die Infusionsrate (Q) folgendermaßen:

$$Q = c_{\min} \times V_p \times k_{el}$$

$c_{\min}$: Plasmakonzentration im steady-state [$\mu\text{g/ml}$]. Sie wurde für diese Versuche mit 25 $\mu\text{g/ml}$ als ausreichend angenommen.

V_p : Volumen des zentralen Kompartments [l/kg].

k_{el} : Eliminationskonstante [h^{-1}]

Die numerischen Werte für V_p und k_{el} wurden aus einer Veröffentlichung über die Pharmakokinetik von Pentetrazol bei Hunden entnommen (Jun 1976). Als Mittelwerte ergaben sich daraus für $V_p = 0,36 \text{ l/kg}$ und für $k_{el} = 1,2 \text{ h}^{-1}$.

Für die Infusionsrate errechnete sich der Zahlenwert:

$$Q = 25 \times 0,36 \times 1,2 \left[\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}} \times \frac{1}{\text{kg}} \times \text{h}^{-1} \right]$$
$$Q = 10,8 \left[\frac{\text{mg}}{\text{kg/h}} \right]$$

Daraus ergab sich für die Bolusdosis (R):

$$R = \frac{Q}{B}$$

wobei β die Eliminationskonstante ist.

Mittelwert für β : $0,57 \text{ h}^{-1}$

$$R = \frac{10,8}{0,57} \left[\frac{\text{mg} \times \text{kg}^{-1} \times \text{h}^{-1}}{\text{h}^{-1}} \right]$$

$$R = 18,9 \left[\text{mg/kg} \right]$$

Mit den nach dieser Methode berechneten Bolusdosen und Infusionsgeschwindigkeiten ist es nicht in allen Fällen gelungen, steady-state Bedingungen zu erreichen. Oft stellte sich ein leichter Anstieg der Plasmakonzentrationen ein. Die erreichten Plasmakonzentrationen lagen meist unter den errechneten Werten, waren aber für den Versuchszweck in der Mehrzahl der Versuche ausreichend hoch. Teilweise wurden höhere Dosen PTZ verwendet um zu auswertbaren EEG-Kurven zu kommen. Der eigentliche Versuch wurde mit der initialen Pentetrazol-Gabe (Bolus R) gestartet. Dazu wurde eine 5 %ige Pentetrazol-Lösung verwendet, die über einen Zeitraum von 3 min über den Femoralis-Katheter verabreicht wurde. Daran anschließend wurde an gleicher Stelle mit der Infusion der isoton eingestellten PTZ-Lösung in der berechneten Rate (Q) begonnen. Das Infusionsvolumen betrug $0,3 \text{ ml/min}$ ("syringe pump", Modell 351, SAGE-Instruments Inc.). Die erste Diazepam- bzw. NDD-Gabe erfolgte frühestens 30 min nach Infusionsbeginn.

Die in den Versuchen verwendeten Bolusdosen und Infusionsgeschwindigkeiten von PTZ sind in Tabelle 1 dargestellt.

Blutprobenentnahme:

Bei den Versuchen mit Diazepam erfolgten die Blut-Entnahmen unmittelbar vor jeder Diazepam-Gabe und jeweils 2 und 7 min danach; bei den Versuchen mit NDD wurden ebenfalls je 5 ml Blut vor der NDD-Gabe und 3 und 8 min nach Beginn der 1 min dauernden NDD-Injektion entnommen. Das Blut wurde mit einer 5 ml Spritze über den Jugularis-Katheter entzogen und in mit Heparin-Na-Kristallen beschickte Plastikreagenzgläser gefüllt, zentrifugiert und das Plasma bis zur Analyse tiefgefroren.

3.1.4.3. Versuchsauswertung

Diazepam-Versuche: Es wurden alle durch Pentetrazol hervorgerufenen spike-wave Komplexe 3 min vor und 10 min nach jeder Diazepam-Injektion auf dem EEG-Papier markiert, für jede Minute

gezählt und graphisch dargestellt.

Unter einem spike-wave Komplex versteht man einen Komplex aus einer Spitze von weniger als 80 msec Dauer und einer langsamen Welle. Im Komplex ist die Spitze der langsamen Welle in der Regel vorgelagert. Sie kann aber auch im aufsteigenden Schenkel der langsamen Welle liegen.

Aus dem 3min-Vorlaufwert wurde das arithmetische Mittel berechnet ($\bar{x}$). Es wurde dann über die ersten 10 min nach Diazepam-Injektion für jede Minute die Anzahl der spike-wave Komplexe ausgerechnet und die prozentuale Reduktion gegenüber der nach dem Verlaufwert zu erwartenden Anzahl für die 10min-Beobachtungsperiode errechnet.

Tab. 1: Sie zeigt die in den einzelnen Versuchen verwendeten Bolusdosen und Infusionsgeschwindigkeiten von Pentetrazol. Weiterhin sind die PTZ-Plasmakonzentrationen 30 min nach Infusionsbeginn dargestellt.

Hund Nr.	R (mg/kg)	Q (mg/kg/h)	PTZ-Konzentration nach 30 min ($\mu\text{g/ml}$)
75	20	20	37,8
77	17	11	15,9
78	24	14	35,7
83	25	15	32,3
84	24	14	26,6
86	18	11	19,6
87	19	11	12,2
89	19	11	20,4
90	19	11	34,9
91	19	11	11,9
92	19	11	19,8
93	24	14	38,8

3.1.4.4. Analytik

3.1.4.4.1. Gaschromatographische Bestimmung der Plasmakonzentrationen von Diazepam und seinen Metaboliten

Diese Bestimmung wurde nach der von Löscher und Frey (1981) beschriebenen Methode vorgenommen.

Extraktion: 0,1 – 0,5 ml Plasma wurden zusammen mit 500 ng Medazepam (interner Standard), gelöst in 50 µl Methanol, und 1,0 ml Benzol in ein Eppendorf-Microtube eingefüllt. Anschließend wurde 1 min auf einem Heidolph Reax I Shaker geschüttelt und danach 1 min bei 12.000 U/min zentrifugiert (Eppendorf Zentrifuge 5412). 400 µl des Überstandes wurden in ein Glasvial überführt und von dieser Lösung 4 µl in einen Gaschromatographen eingespritzt.

Zur Ermittlung der Eichkurve wurden je 50 ng Diazepam, NDD, Oxazepam und 3-Hydroxydiazepam, alle vier Substanzen in 50 µl Methanol gelöst, zu 0,5 ml arzneimittelfreiem Plasma zugegeben. Nach dem Zusetzen von 500 ng Medazepam, gelöst in 50 µl Methanol, und 1,0 ml Benzol wurde entsprechend der oben beschriebenen Weise extrahiert, zentrifugiert und von Überstand 4 µl in den Gaschromatographen eingegeben.

Gaschromatographie: Es wurde ein Varian 3760-Gaschromatograph mit Elektronen-Einfang-Detektor (ECD) verwendet.

Säule: silanisierte (Dichlordimethylsilan 5 % in Toluol) 6 ft Glassäule mit 2 mm Innendurchmesser, gefüllt mit 3 % Sp 2250 auf 100/120 Supelcoport

Die Säulentemperatur lag bei 300°C, die Injektortemperatur bei 330°C und die Detektortemperatur bei 350°C.

Als Trägergas wurde Stickstoff verwendet, mit einer Flußgeschwindigkeit von 20 ml/min.

3.1.4.4.2. Gaschromatographische Bestimmung der PTZ Plasma- und Liquorkonzentrationen

Sie erfolgte in Anlehnung an die Methode von Yonekawa et al. (1980).

Extraktion: 0,5 ml Plasma bzw. Liquor wurden zusammen mit 8 ml Dichlormethan (Extraktionsmittel) und 50 µg Methyl-Propyl-Succinimid (interner Standard, 50 µg MPS in 100 µl Methanol) in ein

13 ml Rundglas eingefüllt und mit einem Glasstopfen verschlossen. Anschließend erfolgte eine 20 minütige Extraktion auf einem Rotationsschüttler. Danach wurde 10 min bei 4000 U/min zentrifugiert (Heraeus Labofuge I). Der wässrige Überstand wurde verworfen. Die organische Phase wurde quantitativ in ein neues 13 ml Rundglas überführt und unter Stickstoff bei 40°C vollständig eingedampft. Der Rückstand wurde in 0,5 ml Methanol gelöst. 0,3 ml dieser Lösung wurden in ein Glasvial überführt und 3 µl davon in einen Gaschromatographen eingespritzt.

Versuche mit Urethan als internem Standard und Chloroform als Extraktionsmittel ergaben für höhere PTZ-Konzentrationen keinen linearen Verlauf. Weitere Bestimmungsversuche mit MPS und Chloroform führten ebenfalls nicht zum gewünschten Ergebnis. Erst bei Verwendung von Dichlormethan und MPS konnte eine brauchbare Eichkurve erstellt werden. Der von Yonekawa et al. (1980) verwendete interne Standard, Heptamethylentetrazol, lag zu Beginn der Bestimmungen nicht vor.

Der Variationskoeffizient (c_v) der oben beschriebenen Methode wurde aus 5 PTZ Proben (50 µg PTZ in 50 µl Aqua bidest.) ermittelt und lag bei 4,5 %; die Recovery zwischen 96 und 105 %. Die untere Nachweisgrenze lag bei 6 µg/ml. Die Eichkurve war bis 100 µg/ml linear.

Die Berechnung der PTZ-Plasma- und Liquorkonzentrationen erfolgte durch den Vergleich der Höhen des Pentetrazolpeaks und der Peakhöhe des internen Standards. Der daraus berechnete Quotient wurde mit einem Tagesfaktor multipliziert, wobei sich der Tagesfaktor aus dem Höhenverhältnis des Pentetrazolpeaks aus einer Probe mit definiertem PTZ-Gehalt (50 µg) und der Peakhöhe des internen Standards dieser Probe berechnen ließ.

Der Tagesfaktor wurde mit dem auf gleiche Weise berechneten Faktor aus der Eichkurve verglichen.

Bei mehr als 10 %iger Abweichung des Tagesfaktors vom Faktor aus der Eichkurve wurden alle Lösungen, einschließlich der Lösung für den 50 µg Pentetrazol-Wert neu angesetzt und erneut gaschromatographisch bestimmt.

Gaschromatographie: Es wurde ein Varian 3760-Gaschromatograph mit Flammenionisationsdetektor (FID) verwendet.

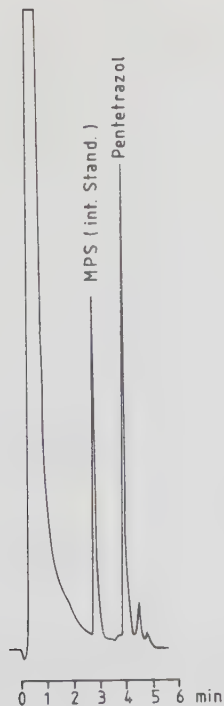
Säule: silanisierte (Dichlordimethylsilan 5 % in Toluol) 6 ft Glassäule mit 2 mm Innendurchmesser, gefüllt mit 3 % Sp 2250

auf 100/120 Supelcoport

Säulentemperatur: Die initiale Säulentemperatur lag bei 130°C.

Als Trägergas wurde Stickstoff verwendet, mit einer Flußgeschwindigkeit von 15 ml/min.

Abb. 5: Gaschromatogramm eines Extraktes aus 0,5 ml Plasma, dem 50 µg PTZ und 50 µg MPS (interner Standard) zugefügt wurden.



3.2. Ergebnisse

3.2.1. Subakute Behandlung

Die Krampfschwellen lagen am 1. Versuchstag bei $12 \pm 2,6$ mg/kg. Die Krampfschwelle von Hund Nr. 88 ging in diese Berechnung nicht mit ein, hier lag der Wert bei 27,7 mg/kg.

3.2.1.1. Behandlung mit 0,25 mg/kg Diazepam

Die Ergebnisse sind in Tab. 2 und Abb. 6 dargestellt. Bei allen Hunden zeigte sich ein Anstieg der Krampfschwelle am 8. Versuchstag. Die Plasmakonzentrationen von Diazepam und NDD waren nach einer bzw. zwei Wochen Diazepam-Behandlung mit den Plasmakonzentrationen des 8. Tages identisch. Trotzdem konnte bei zwei Hunden (Nr. 78, Nr. 64) ein vollständiger Verlust der antikonvulsiven Wirkung von Diazepam nach einer Woche festgestellt werden, und bei Hund Nr. 72 war ein deutlicher Abfall der Krampfschwelle von 19,9 auf 14,1 mg/kg zu bemerken.

3.2.1.2. Behandlung mit 0,5 mg/kg Diazepam

Nach Injektion von 0,5 mg/kg Diazepam i.v. am Tag 8 lag die Krampfschwelle 2 - 2,8 mal höher als im Kontrollversuch eine Woche früher. Nach einer Woche Behandlung mit 3 x täglich 0,5 mg/kg Diazepam konnte bei allen Tieren ein deutlicher Abfall der Krampfschwellen festgestellt werden. Die Diazepam-Plasmakonzentrationen zeigten sich gegenüber den Konzentrationen des 8. Tages unverändert. Für NDD war eine leichte Kumulation zu bemerken.

Die Ergebnisse der Versuche sind in Tab. 3 und Abb. 7 dargestellt.

3.2.1.3. Behandlung mit Diazepam/Chlorazepat

Auch in dieser Versuchsreihe konnte bei allen 4 Hunden eine Senkung der Krampfschwellen am Behandlungsende beobachtet werden, bei Hund Nr. 83 sogar auf den Ausgangswert, obwohl die Diazepam-Plasmakonzentration am Behandlungsende wie am Tag 8 war und die NDD-Konzentration in der Behandlungswoche

erheblich gestiegen war.

Bei 2 Hunden (Nr. 73, Nr. 91) kam es zu einer starken Kumulation von NDD.

Die Ergebnisse der Versuche sind in Tab. 4 und Abb. 8 dargestellt.

3.2.1.4. Behandlung mit NDD/Chlorazepat

Bei diesen mit NDD (2 mg/kg i.v.) bzw. der Vorstufe von NDD (Chlorazepat, 3 x tgl. 2 mg/kg oral) behandelten Tieren konnte eine deutliche Korrelation zwischen den vorhandenen NDD-Plasmakonzentrationen und der Höhe der Krampfschwellen beobachtet werden. Bei der ersten Krampfschwellenbestimmung, am 8. Tag, wurden 10 min nach der i.v. Injektion von 2 mg/kg NDD-Plasmakonzentrationen zwischen 1300 und 1500 ng/ml bestimmt, ein entsprechender Anstieg der NDD-Plasmakonzentration wurde bei Hund Nr. 90 auch am 15. Tag beobachtet. Bei den Hunden Nr. 87 und 88 betrugen die Anstiege nach NDD an den Tagen 15 und 22 jedoch nur zwischen 500 und 1200 ng/ml, was als Ausdruck einer beschleunigten Elimination aufgefaßt werden kann.

Die Ergebnisse sind in Tab. 5 und Abb. 9 dargestellt.

Tab. 2: Ergebnisse der Krampfschwellenbestimmungen bei den 3 mit 3 x tgl. 0,25 mg/kg Diazepam behandelten Hunden. Zur Bestimmung der Krampfschwelle an den Tagen 8, 15 (und 22) wurden 0,25 mg/kg Diazepam i.v. injiziert.

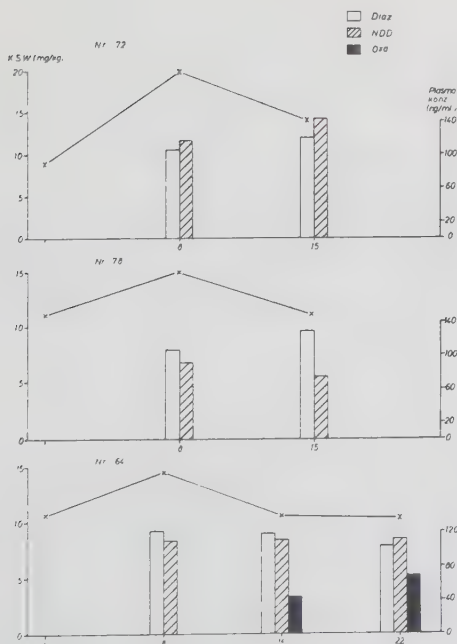
Nr	Tag	Gew (kg)	P.-Lsg. (%)	Zeit (s)	Verbr (ml)	Pl.-Konz. (ng/ml)				K.S.W. (mg/kg)
						t	D	NDD	Oxa	
78	1	13.4	4.5	68	3.4	/	-	-	-	11.4
	8	13.0	4.3	91	4.6	15'	107	92	-	15.0
	15	13.8				0	1-	19	1-	
			4.3	73	3.7	15'	129	75	1-	11.4
72	1	10.3	3.0	62	3.1	/	-	-	-	9.0
	8	11.3	3.0	150	7.5	15'	106	117	1-	19.8
	15	11.5				0	1-	1-	1-	
			3.0	108	5.4	15'	120	144	1-	14'
64	1	26.5	8.8	65	3.3	/	-	-	-	10.8
	8	25.9	8.8	86	4.3	15'	122	110	1-	14.6
	15	27.5				0	1-	19	1-	
			8.8	66	3.3	15'	118	111	44	10.6
	22	27.5				0	-	23	39	
			8.8	65	3.3	15'	104	111	68	10.4

- t : Zeit nach i.v. Diazepam-Injektion
 0' : Konzentrationen vor Diazepam-Injektion
 15' : Die hinter 15' angegebenen Plasmakonzentrationen sind die interpolierten 15min-Werte aus den Blutproben unmittelbar vor der Krampfschwellen-Bestimmung und nach dem Krampf.
 P.-Lsg (%) : Konzentration der PTZ-Lösung in Prozent
 Pl.-Konz. : Plasmakonzentrationen von Diazepam (D), N-Desmethyldiazepam (NDD) und Oxazepam (Oxa)
 K.S.W. : Krampfschwellenwert

Abb. 6: Graphische Darstellung der Versuchsergebnisse in der mit 3 x tgl. 0,25 mg/kg Diazepam behandelten Gruppe (vgl. auch Abb. 2 und Tab. 2)

Die oberhalb dem 8., 15. bzw. 22. Tag dargestellten Säulendiagramme stellen die interpolierten 15min-Werte von Diazepam, NDD und Oxazepam dar.

Auf der linken Ordinate sind die Krampfschwellenwerte in mg/kg Pentetrazol abgetragen, rechts die Skala für die Plasmakonzentrationen von Diazepam, NDD und Oxazepam zum Zeitpunkt der Krampfschwellenbestimmungen.



Tab. 3: Ergebnisse der Krampfschwellenbestimmungen bei den 4 mit 3 x tgl. 0,5 mg/kg Diazepam behandelten Hunden. Zur Bestimmung der Krampfschwelle an den Tagen 8 und 15 wurden 0,5 mg/kg Diazepam i.v. injiziert.

N. Tier	Tag	Zeit nach i.v. Diazepam-Injektion				Konzentration vor Diazepam-Injektion				K.S.W.
		0'	15'	30'	60'	1'	2'	100'	240'	
1.	1	138	4,5	80	80	—	—	—	—	3,8
	8	137	4,5	100	84	10'	170	15	17	20,8
	15	137				1'	—	15	—	
2.			4,5	85	4,5	1'	105	30	44	14,0
	1	132	4,5	84	4,5	—	—	—	—	13,4
	8	127	4,5	115	112	10'	180	15	—	18,4
3.	15	132				1'	—	15	44	
			4,5	107	5,0	10'	177	180	30	17,1
	1	128	1,5	71	17	—	—	—	—	12,1
4.	8	127	1,5	102	7,5	10'	175	115	18	14,4
	15	125				1'	—	112	30	
			1,5	100	3,0	1'	167	115	15	13,8
5.	1	125	1,5	82	10	—	—	—	—	12,8
	8	121	4,5	105	3,0	10'	200	150	10	10,8
	15	118				1'	—	10	—	
6.			4,5	106	6,0	1'	197	150	30	13,8

- 0' : Zeit nach i.v. Diazepam-Injektion
 10' : Konzentration vor Diazepam-Injektion
 100' : Die hinter 10' angegebenen Plasmakonzentrationen sind die interpolierten 10min-Werte aus den Blutproben vor der Krampfschwellen-Bestimmung und nach dem Krampf
 P.L.-Lös. 10' : Konzentration der PTL-Lösung in Prozent
 Pl.-konz. : Plasmakonzentrationen von Diazepam (D'), N-Des-methyldiazepam (NDD) und Oxazepam (Oxal)
 K.S.W. : Krampfschwellenwert

Abb. 3: Graphische Darstellung der Versuchsergebnisse in der mit 3 x tgl. 0,5 mg/kg Diazepam behandelten Gruppe (vgl. auch Abb. 2 und Tab. 3).

Die Stadien der 8. und 10. Tag dargestellten Verlaufdiagramme stellen die interindividuellen Schwankungen von Diazepam, 900 und Oxazepam dar.

Aus der linken Ordinate sind die Konzentrationen in mg/lg festzulesen, ebenso die Werte für die Plasmaspiegel von Diazepam, 900 und Oxazepam zum Zeitpunkt der Konzentrationserhebungen.



Tab. 4: Ergebnisse der Krampfschwellenbestimmungen bei den 4 mit 3 x tgl. 1,0 mg/kg Chlorazepat behandelten Hunden. Zur Bestimmung der Krampfschwelle an den Tagen 8 und 15 wurden 0,5 mg/kg Diazepam i.v. injiziert.

Nr	Tag	Gew. (kg)	P.-Lsg. (%)	Zeit (s)	Verbr. (ml)	Pl.-Konz (ng/ml)				K S W (mg/kg)
						t	D	NDD	Oxa	
73	1	15,0	4,8	48	2,4	/	-	-	-	7,7
	8	15,1	4,8	81	4,0	15'	272	165	34	12,9
	15	15,0				0'	-	800	110	
			4,8	63	3,2	15'	402	853	116	10,1
92	1	12,6	4,2	68	3,4	/	-	-	-	11,3
	8	12,5	4,2	128	6,4	15'	265	172	19	21,5
	15	12,6				0'	-	260	54	
			4,2	88	4,4	15'	306	421	59	14,7
83	1	14,3	4,7	97	4,9	/	-	-	-	15,9
	8	13,7	4,7	132	6,6	15'	228	204	18	22,6
	15	13,8				0'	-	259	24	
			4,5	97	4,9	15'	195	422	72	15,8
91	1	10,8	3,6	66	3,3	/	-	-	-	11,0
	8	11,4	3,6	146	7,3	15'	295	220	(-)	22,9
	15	11,7				0'	-	537	64	
			4,0	103	5,2	15'	389	662	76	17,6

0' : Konzentrationen vor Diazepam-Injektion

15' : Die hinter 15' angegebenen Plasmakonzentrationen sind die interpolierten 15min-Werte aus den Blutproben unmittelbar vor der Krampfschwellen-Bestimmung und nach dem Krampf.

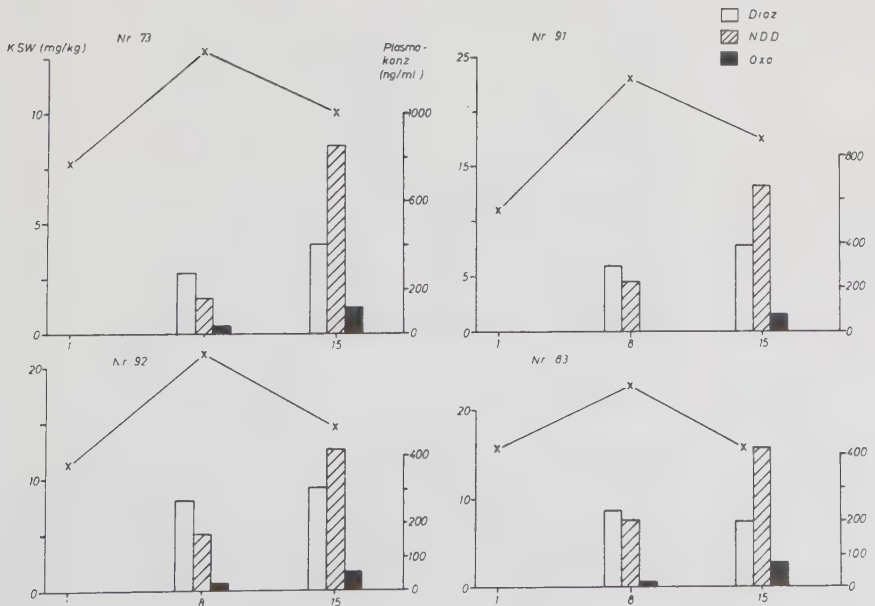
P.-Lsg (%) : Konzentration der PTZ-Lösung in Prozent

Pl.-Konz : Plasmakonzentrationen von Diazepam (D), N-Desmethyldiazepam (NDD) und Oxazepam (Oxa)

K.S.W. : Krampfschwellenwert

Abb. 8: Graphische Darstellung der Versuchsergebnisse in der mit 3 x tgl. 1,0 mg/kg Chlorazepat behandelten Gruppe (vgl. auch Abb. 2 und Tab. 4)

Die oberhalb dem 8. und 15. Tag dargestellten Säulendiagramme stellen die interpolierten 15min-Werte von Diazepam, NDD und Oxazepam dar. Auf der linken Ordinate sind die Krampfschwellenwerte in mg/kg Pentetrazol abgetragen, rechts die Skala für die Plasmakonzentrationen von Diazepam, NDD und Oxazepam zum Zeitpunkt der Krampfschwellenbestimmungen.



Tab. 5. Ergebnisse der Krampfschwellenbestimmungen bei den 3 mit 3 x tgl. 2,0 mg/kg Chlorazepat behandelten Hunden. Zur Bestimmung der Krampfschwelle an den Tagen 8, 15 (und 22) wurden 2,0 mg/kg NDD infundiert.

Nr.	Tag	Gew. (kg)	PLsg (%)	Zeit (s)	Verbr (ml)	Pl.-Konz (ng/ml)	K S W (mg/kg)	
						t	NDD	Oxa
38	1	8,6	2,8	170	3,5	-	-	27,7
	8	8,2	2,8	210	25,5	10	1431	-
	15	9,1				0'	752	91
			3,2	417	20,9	10'	1425	148
	22	9,5				0'	792	79
			3,2	430	21,5	10'	1325	102
39	1	13,1	4,4	90	4,5	/	-	-
	8	12,8	4,3	275	13,7	10'	1471	(-)
	15	12,7				0	828	128
			4,2	385	18,7	10	1891	171
	22	12,6				0	1025	125
			4,2	302	18,1	10	1648	150
40		12,8	4,2	90	4,5	/	-	-
	8	13,1	4,5	242	12,1	10	1327	141
	15	13,1				0	824	81
			4,2	380	18,5	10	1831	171

0' : Konzentration vor NDD-Infusion

10' : Die hinter 10' angegebenen Plasmakonzentrationen sind die interpolierten 10min-Werte aus den Blutproben unmittelbar vor der Krampfschwellen-Bestimmung und nach dem Krampf.

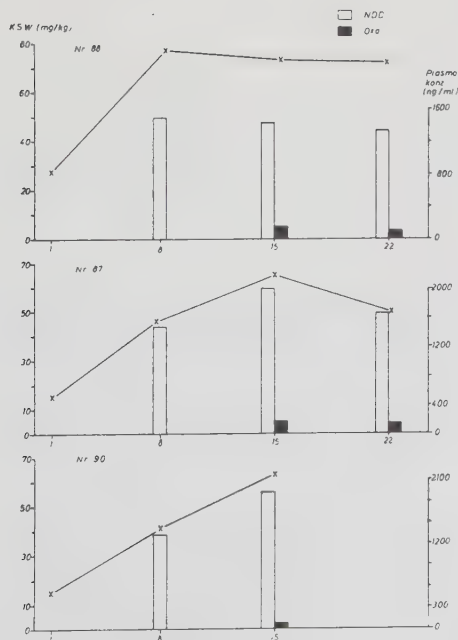
PLsg (%): Konzentration der PTZ-Lösung in Prozent

Pl.-Konz. : Plasmakonzentrationen von N-Desmethyldiazepam (NDD) und Oxazepam (Oxa)

K.S.W. : Krampfschwellenwert

Abb. 9: Graphische Darstellung der Versuchsergebnisse in der mit 3 x tgl. 2,0 mg/kg Chlorazepat behandelten Gruppe (vgl. auch Abb. 2 und Tab. 5)

Die oberhalb dem 8., 15. bzw. 22. Tag dargestellten Säulendiagramme stellen die interpolierten 10min-Werte von NDD und Oxazepam dar. Auf der linken Ordinate sind die Krampfschwellenwerte in mg/kg Pentetrazol abgetragen, rechts die Skala für die Plasmakonzentrationen von NDD und Oxazepam zum Zeitpunkt der Krampfschwellenbestimmungen.



3.2.1.5. Vergleich der antikonvulsiven Wirkungsstärke von Diazepam gegenüber NDD

Zum Vergleich der Wirkungsstärke von Diazepam gegenüber NDD wurde davon ausgegangen, daß die Erhöhung der Krampfschwelle am 8. Tag ausschließlich auf der antikonvulsiven Wirkung von Diazepam beruhte. Bei allen mit 0,5 mg/kg Diazepam (i.v.) behandelten Tieren wurde der Quotient aus der Diazepam-Plasmakonzentration und dem Faktor der Krampfschwellenerhöhung am 8. Tag gebildet (Tab. 6). Es berechnete sich daraus ein Mittelwert von 135 ± 29 . Analog wurde bei allen mit 2 mg/kg NDD (i.v.) behandelten Tieren der gleiche Quotient gebildet. Hier blieb die Berechnung des Quotienten nicht nur auf den 8. Tag beschränkt, da sich der enge Zusammenhang der NDD-Plasmakonzentrationen mit den Werten der Krampfschwellen auch am 15. und 22. Tag zeigte (Tab. 7). Es ließ sich bei NDD-Behandlung ein Mittelwert von 493 ± 34 berechnen. Ein Vergleich dieser beiden Mittelwerte zeigte, daß zum Erreichen gleicher Krampfschwellen-Erhöhungen für NDD eine 3,7 fach höhere Plasmakonzentration notwendig war. Mit anderen Worten ausgedrückt; setzt man die antikonvulsive Wirkungsstärke von Diazepam gleich 1, erhält man für NDD den Faktor 0,27.

Tab. 6: Zusammenhang zwischen Diazepam-Plasmakonzentration (ng/ml) und dem Faktor der Krampfschwellenerhöhung (K.S.E.) am Tag 8

Hund Nr.	73	92	83	91	84	75	82	76
D.-Konz.	272	265	228	295	270	380	216	223
K.S.E.	1,7	1,9	1,4	2,1	2,1	2,4	2,0	2,8
D/K.S.E.	160,0	139,5	162,9	140,5	128,6	158,3	108,0	79,6

Tab. 7: Zusammenhang zwischen NDD-Plasmakonzentration und dem Faktor der Krampfschwellenerhöhung (K.S.E.)

Hund Nr.	88			87			90	
Tag	8	15	22	8	15	22	8	15
NDD-Konz.	1481	1425	1325	1471	1991	1649	1327	1931
K.S.E.	2,8	2,6	2,6	3,1	4,3	3,3	2,8	4,3
NDD/K.S.E.	529	548	510	474	463	500	474	449

3.2.2. Ergebnisse der Versuche zum Nachweis der akuten Toleranz

3.2.2.1. Beschreibung der Elektroenzephalogramme

3.2.2.1.1. EEG vor Pentetrazol-Gabe

In Abb. 10a ist der charakteristische EEG-Verlauf unmittelbar vor der initialen Pentetrazol-Gabe dargestellt.

Im EEG zeigte sich eine mittelamplitudige (zwischen 20 und 30 μ V), vorwiegend unregelmäßige Aktivität mit Frequenzen um 4-6/sec. Zusätzlich traten Unterlagerungen langsamerer Wellenformen um 2-3/sec, sowie raschere Frequenzen um 8-10/sec und 12-18/sec auf.

3.2.2.1.2. EEG während der PTZ-Bolusgabe

Die ersten durch PTZ bedingten Veränderungen im EEG waren 0,5 bis 1 min nach Beginn der 3 min dauernden PTZ-Bolusapplikation zu bemerken. Aus der unregelmäßigen flachen Aktivität ohne einen stabilen Rhythmus erfolgte ein Übergang in eine paroxysmale Aktivität, rekrutierend, mit hochamplitudigen, steilen Wellen und Spitzen mit langsamer Nachschwankung, wobei einzelne Spitzen nicht zu erkennen waren und die Nachschwankungen alleine auftraten. Es ergab sich das charakteristische Muster von spike-wave Komplexen. Diese traten in rhythmischer Abfolge auf; die Frequenzen lagen hauptsächlich bei 3/sec. Zum Teil bildeten sich schnellere Folgen um 4-5/sec (Abb. 10b₁). Aus der Phase b₁ erfolgte sehr schnell der Übergang zu b₂. Es zeigte sich eine Krampfaktivität mit äußerst rasch aufeinanderfolgenden Spitzen ohne langsame Nachschwankungen, hochamplitudig und rekrutierend. Die Amplituden der Krampfpotentiale waren dabei so groß, daß die Schreiber übersteuert wurden (Abb. 10b₂).

Bei allen Versuchen zeigte sich 30 - 40 sec nach dem Beginn dieser Spitzenpotentiale ein Erschöpfungsstadium (post-/interictale Depression) mit unterschiedlicher Zeitdauer; maximal bis 20 sec (Abb. 10c). Diese Phase war durch einen abrupten Zusammenbruch der gesamten Aktivität mit Spannungsdepression gekennzeichnet. Dabei waren kaum noch Frequenzen nachweisbar und nur flache unregelmäßige Schwankungen. Dieses Stadium wurde durch ein abrupt-

tes Auftreten von Krampfpotentialen beendet. Im Verlauf der Krampfaktivität zeigte sich eine Zunahme langsamerer Wellenanteile, und es bildeten sich erneut spike-wave Komplexe.

Abb. 10: EEG vor und während PTZ-Bolusgabe (Hund Nr. 93).

Dargestellt sind das EKG und die EEG-Ableitungen

K₅ und K₆ (s. Abb. 4).

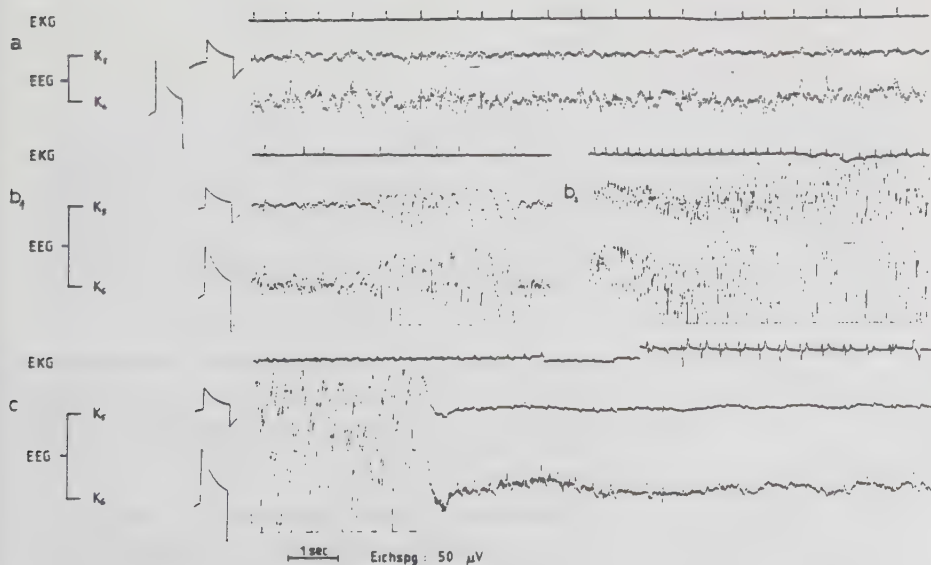
a : EEG unmittelbar vor Beginn der PTZ-Bolusgabe (24 mg/kg)

b₁: EEG 0,5 - 1 min nach Beginn der PTZ-Injektion

b₂: Spitzenpotentiale gegen Ende der PTZ-Bolusinjektion

c : post-/interictale Depression, 30 - 40 sec nach dem Beginn der Spitzenpotentiale, max. 20 sec Dauer

Die sich im EKG darstellenden Extrasystolen traten nur bei Hund Nr. 93 und nur während dieser Phase auf.



3.2.2.1.3. EEG vor und nach Gabe von Diazepam

Das EEG vor den Diazepam-Gaben war durch eine intermittierend ausgeprägte Grundaktivität gekennzeichnet, wobei der Theta-Rhythmus gehäuft vorkam. Dazwischen befanden sich häufig Einlagerungen paroxysmal auftretender, unregelmäßiger spike-wave Komplexe und vereinzelt Spitzenpotentialie ohne langsame Nachschwankung (Abb. 11a). Nach der Diazepam-Injektion erfolgte eine Verringerung des Theta-Anteils und eine Zunahme hochamplitudiger Wellen um 2 - 3/sec (Abb. 11b).

Ein Nachlassen der Diazepam-Wirkung war von einer Zunahme der Frequenzen im Theta-Bereich gekennzeichnet. Weiterhin waren intermittierende Einlagerungen hochamplitudiger Gruppen von Spitzenpotentialien in unregelmäßiger Abfolge und Spitzenpotentialie mit hochamplitudigen Nachschwankungen zu beobachten, die meist mit einer Frequenz von 3/sec auftraten (Abb. 11c).

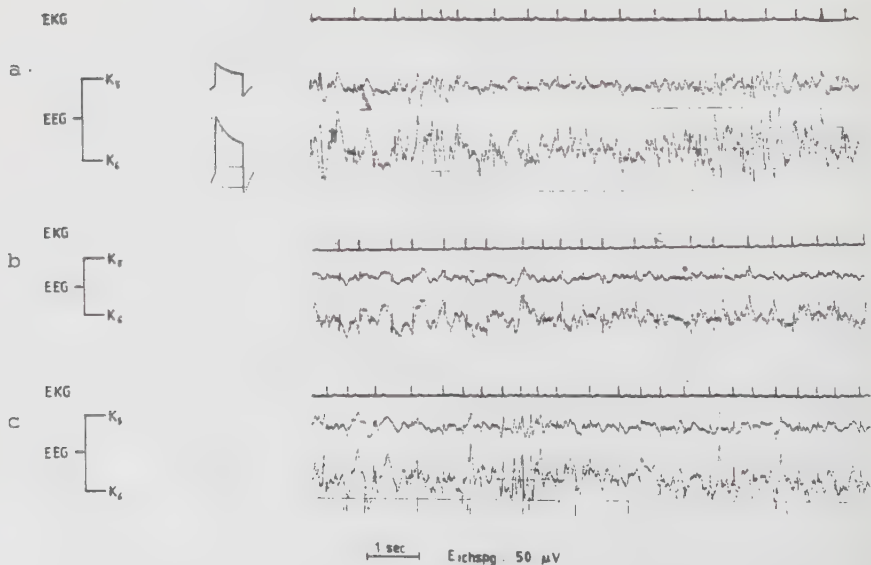
Abb. 11: EEG vor und nach Gabe von Diazepam bei Hund Nr. 93.

Dargestellt sind das EKG und die EEG-Ableitungen K_5 und K_6 (s. Abb. 4)

a: EEG vor Diazepam

b: EEG 2 min nach Gabe von 0,25 mg/kg Diazepam

c: EEG 8 min nach Diazepam



3.2.2.2. Herzfrequenz während der Versuche mit NDD und Diazepam

Die Kontrolle einer ausreichenden Analgesie erfolgte mittels der Herzfrequenz. Nach dem Überschreiten eines Wertes von 120/min wurde versucht, durch erneute Piritramid-Gaben (1 ml $\hat{=}$ 7,5 mg Piritramid-Base) über den Cephalica-Katheter eine Senkung der Herzfrequenz zu erreichen. Bei allen 9 Hunden der Diazepam- und NDD-Versuche konnte während der PTZ-Bolusinjektion ein Anstieg der Herzfrequenz auf das 3 - 3,5fache der Ausgangswerte beobachtet werden. Maximalwerte lagen hierbei um 280/min. Bei 5 dieser 9 Tiere senkte sich die Frequenz innerhalb von 20 min nach Beginn der PTZ-Infusion auf Werte unter 120/min, zeigte aber während der Versuchsdauer eine Anstiegstendenz. Ein Anstieg konnte aber durch 2 - 3malige Piritramid-Gaben vermieden werden. Bei den anderen 4 Tieren (Nr. 86, Nr. 75, Nr. 92, Nr. 93) zeigte sich nach einem PTZ-bedingten Anstieg nur ein geringer Abfall der Herzfrequenz auf Werte zwischen 144 und 216/min. Selbst durch mehrmalige Piritramid-Injektionen war eine Senkung der Frequenz nicht mehr möglich.

3.2.2.3. Blutdruck

Der Verlauf der Blutdruck-Kurve war bei allen Tieren einheitlich. Es zeigte sich während der initialen PTZ-Gabe ein rascher Anstieg auf systolische Spitzenwerte von 350 mm Hg. Eine Normalisierung auf die Ausgangswerte erfolgte spätestens 20 min nach PTZ-Infusionsbeginn. Nach jeder Gabe von Diazepam und NDD war ein leichter Blutdruckabfall um 20 - 30 mm Hg festzustellen, der 2 - 3 min nach Injektionsbeginn kompensiert war. Bei Hund Nr. 78 zeigte sich ein kontinuierlicher Blutdruckabfall während der gesamten Versuchsdauer, er wurde deshalb nicht zur Auswertung herangezogen.

3.2.2.4. Körpertemperatur

Während der ersten Stunde nach PTZ-Infusionsbeginn war ein auffallender Anstieg der Körpertemperatur bei 8 von 9 Hunden zu beobachten. Die Körpertemperatur konnte durch Senkung der Raumtemperatur von anfangs 30° auf 20°C bei 5 dieser Tiere innerhalb physiologischer Grenzen gehalten werden. Bei 3 Hunden war

es zusätzlich erforderlich den Rumpf mit kalten Tüchern zu bedecken. Auch mit dieser Maßnahme war es schwierig die Körpertemperatur unter 40°C zu halten.

Bei insgesamt 6 Versuchen, in denen jeweils 4 - 5 Injektionen Diazepam gegeben wurden, ließ sich 4 mal kein Anzeichen für eine akute Toleranz nachweisen, während 2 Hunde dieses Phänomen erkennen ließen.

Die Ergebnisse werden im folgenden für die einzelnen Versuche dargestellt.

Tab. 8 gibt eine zusammenfassende Darstellung der Veränderungen in der Anzahl der spike-wave Komplexe für alle Versuche.

3.2.2.5. Ergebnisse der Versuche mit Diazepam

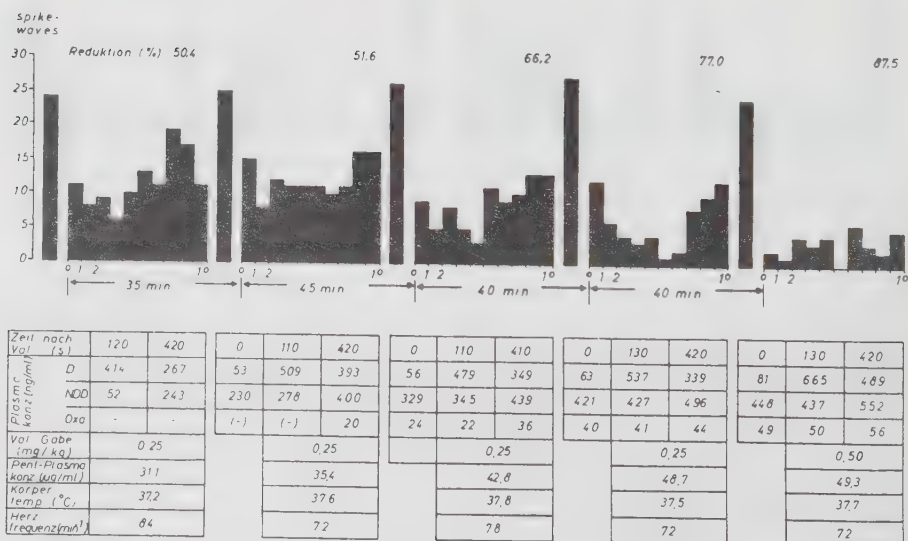
Die Ergebnisse werden in den Abb. 12 - 17 folgendermaßen dargestellt: Auf der Ordinate eines Säulendiagramms werden alle spike-wave Komplexe aufgetragen, die im oben beschriebenen Zeitraum ausgezählt wurden. Die arithmetischen Mittelwerte der Anzahl der spike-waves im 3min-Vorlauf der einzelnen Diazepam-Gaben werden als alleinstehende Säule dargestellt. Zum Zeitpunkt "0" erfolgten die Diazepam-Injektionen, deren zeitlicher Abstand den Abbildungen zu entnehmen ist. Die während den nachfolgenden 10 min aufgetretenen spike-wave Komplexe werden für jede Minute gezählt und graphisch dargestellt. Die Reduktionswerte (%) der spike-wave Anzahl über 10 min werden oberhalb der Säulendiagramme angegeben. Die weiteren Ergebnisse der Versuche werden unterhalb der Säulendiagramme dargestellt. Die PTZ-Plasmakonzentrationen wurden als arithmetischer Mittelwert aus den Konzentrationen der Blutproben vor und 2 und 7 min nach jeder Diazepam-Gabe berechnet.

Hund Nr. 75 (Abb. 12)

In diesem Versuch wurden $4 \times 0,25 \text{ mg/kg}$ Diazepam im Abstand von 60 min verabreicht. Die PTZ-Bolusdosis und Infusionsgeschwindigkeit lagen bei 20 mg/kg bzw. 20 mg/kg/h . Es zeigte sich ein starker Anstieg der PTZ-Plasmakonzentrationen von $39,8$ auf $75,3 \mu\text{g/ml}$. Der Grund hierfür lag in der zu hoch dosierten Infusion. Dennoch waren die Mittelwerte der spike-wave Komplexe im Vorlauf ver-

0,25 und zum Abschluß 1 x 0,5 mg/kg Diazepam injiziert. Bei diesem Hund zeigte sich eine kontinuierliche Zunahme der Reduktion auf einen Wert von 87,5 %. Die Diazepamwirkung hielt 10 min nach der Injektion noch an. Die Körpertemperatur und die Herzfrequenz waren konstant. Für die PTZ-Plasmakonzentrationen konnte ein leichter Anstieg festgestellt werden.

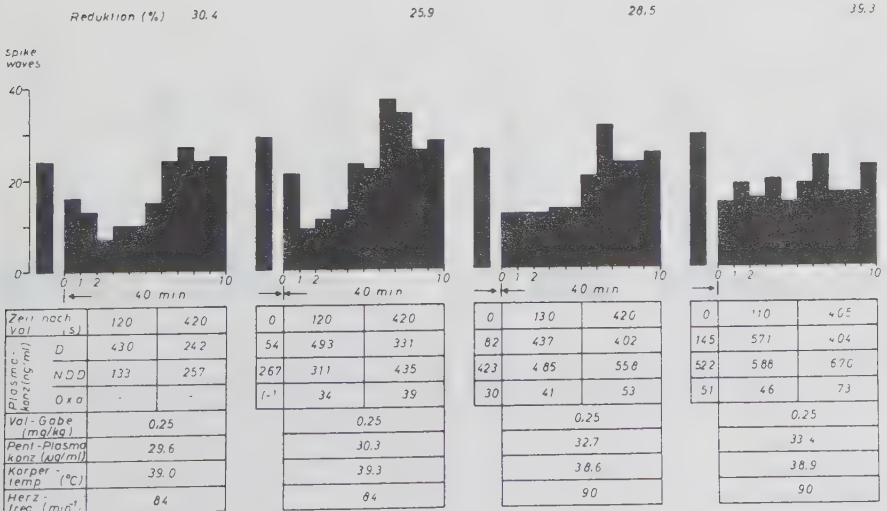
Abb. 13: Graphische Darstellung der spike-wave Komplexe 3 min vor und 10 min nach jeder Gabe von Diazepam (4 x 0,25 mg/kg, 1 x 0,5 mg/kg) bei Hund Nr. 83. Der arithmetische Mittelwert ($\bar{x}$) aus dem 3min-Vorlauf ist als alleinstehende Säule dargestellt. Der Reduktionswert (%) ist oberhalb der Säulendiagramme angegeben. Die PTZ-Bolusdosis und die PTZ-Infusionsgeschwindigkeit lagen bei 25 mg/kg bzw. 15 mg/kg/h. Die weiteren Ergebnisse des Versuches sind unterhalb der Säulendiagramme dargestellt.



Hund Nr. 84 (Abb. 14)

Diesem Hund wurden im Abstand von durchschnittlich 40 min 4 x 0,25 mg/kg Diazepam injiziert. Bei diesem Versuch zeigte sich nur eine schwache Diazepamwirkung, die bei den ersten 3 Gaben innerhalb 6 - 7 min beendet war, d.h., die spike-wave Werte erreichten oder überschritten die Vorlaufwerte. Für PTZ wurde ein steady-state erreicht. Nach der 2. Diazepam-Injektion war eine geringe Abnahme des Reduktionswertes von 30,4 auf 25,9 % festzustellen, obwohl die Diazepam-, NDD- und die Oxazepam-Konzentrationen über den Konzentrationen nach der 1. Diazepam-Gabe lagen. Eine Toleranzentwicklung bestätigte sich aber nach 2 weiteren Diazepam-Injektionen nicht.

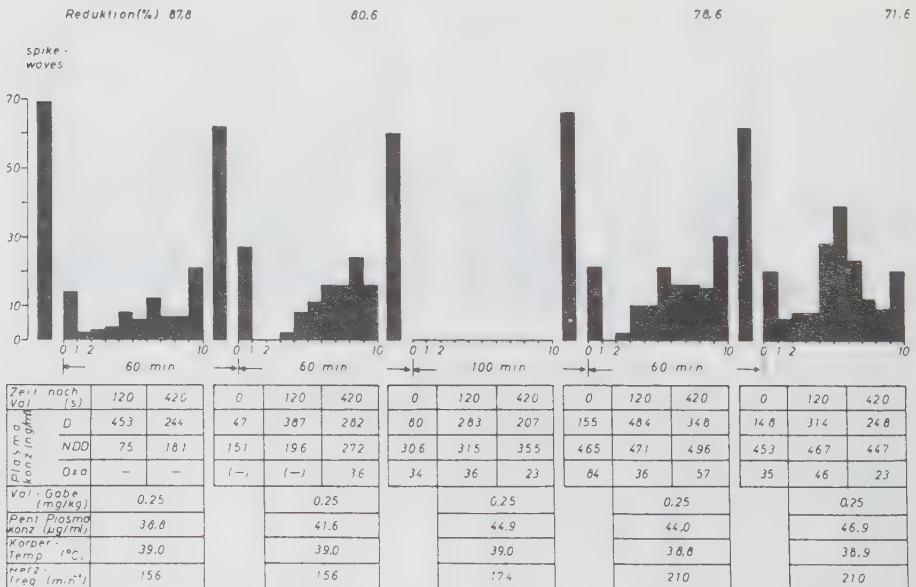
Abb. 14: Graphische Darstellung der spike-wave Komplexe 3 min vor und 10 min nach jeder Gabe von Diazepam (4 x 0,25 mg/kg) bei Hund Nr. 84. Der arithmetische Mittelwert ($\bar{x}$) aus dem 3min-Vorlauf ist als alleinstehende Säule dargestellt. Der Reduktionswert (%) ist oberhalb der Säulendiagramme angegeben. Die PTZ-Bolusdosis und die PTZ-Infusionsgeschwindigkeit lagen bei 24 mg/kg bzw. 14 mg/kg/h. Die weiteren Ergebnisse des Versuches sind unterhalb der Säulendiagramme dargestellt.



Hund Nr. 93 (Abb. 15)

In diesem Versuch wurde 5 x Diazepam injiziert (5 x 0,25 mg/kg). Der zeitliche Abstand der Injektionen betrug 60 bzw. 100 min. Eine auffallend starke Diazepamwirkung konnte bei hohen spike-wave Vorlaufwerten sofort nach der 1. und 2. Gabe von Diazepam festgestellt werden. Nach der 3. Injektion trat eine Verstärkung der Wirkung auf. Der Reduktionswert konnte bis 38 min nach Diazepam-Gabe mit 100 % angegeben werden. Erst danach war ein erneutes Auftreten von spike-wave Komplexen zu beobachten. Das EEG innerhalb dieser 38 min war mit dem EEG bei stärkster Diazepamdepression in Abb. 11b vergleichbar. Der Zeitabstand zwischen der 3. und 4. Diazepam-Applikation wurde aufgrund der lang anhaltenden Diazepamwirkung auf 100 min verlängert. Nach der 4. und 5. Diazepam-Injektion trat keine verlängerte Wirkung auf. Hier lagen die Reduktionswerte bei 78,6 bzw. 71,6 %.

Abb. 15: Graphische Darstellung der spike-wave Komplexe 3 min vor und 10 min nach jeder Gabe von Diazepam (5 x 0,25 mg/kg) bei Hund Nr. 93. Der arithmetische Mittelwert ($\bar{x}$) aus dem 3min-Vorlauf ist als alleinstehende Säule dargestellt. Der Reduktionswert (%) ist oberhalb der Säulendiagramme angegeben. Die PTZ-Bolusdosis und die PTZ-Infusionsgeschwindigkeit lagen bei 24 mg/kg bzw. 14 mg/kg/h. Die weiteren Ergebnisse des Versuches sind unterhalb der Säulendiagramme dargestellt.



Tab 8: Anzahl der spike-wave Komplexe in den Versuchen mit Diazepam-Behandlung

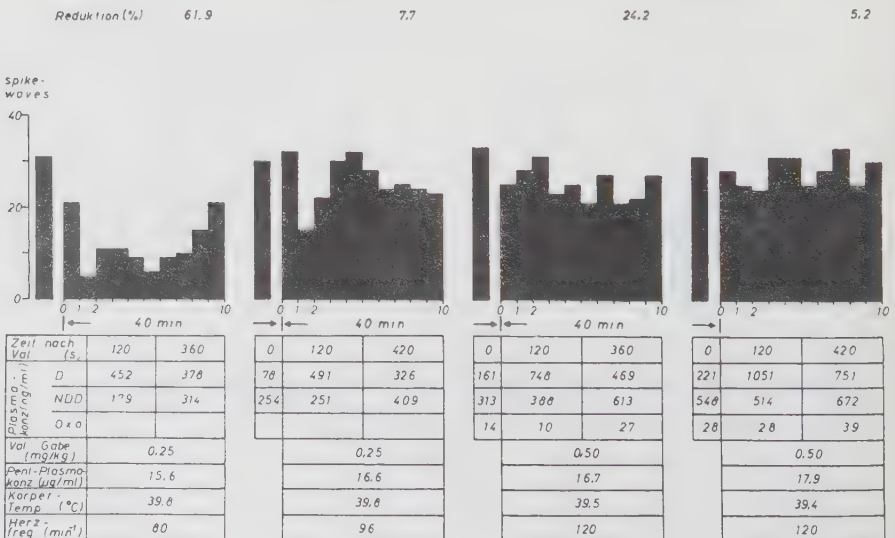
$\begin{matrix} m, n \\ Nr \end{matrix}$	1	2	3	$\bar{x}$	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
75	50	50	56	57	14	8	7	5	9	7	11	18	23	26
	51	51	50	51	15	5	7	30	26	40	26	21	39	35
	54	48	47	50	19	4	3	5	6	11	24	19	34	32
	65	57	61	61	10	5	9	8	15	14	20	17	32	32
77	34	29	30	31	21	5	11	11	9	6	9	10	15	21
	28	31	32	30	32	15	22	30	32	28	24	25	24	23
	36	29	34	33	25	28	31	23	25	21	27	21	22	27
	30	35	27	31	28	25	24	31	31	25	28	33	25	30
83	21	26	25	24	11	8	9	6	10	13	11	19	17	11
	29	20	27	25	15	8	12	11	11	11	10	11	16	16
	19	33	25	26	9	5	8	5	3	11	9	10	13	13
	23	31	28	27	12	6	4	3	4	1	2	8	10	12
	25	16	30	24	2	1	4	3	4	0	6	3	2	5
84	28	24	21	24	16	13	7	10	10	15	24	27	24	25
	28	23	33	28	21	9	11	13	23	22	37	34	26	28
	26	25	26	26	12	12	12	13	13	20	31	23	23	25
	26	37	24	29	14	18	15	19	14	18	24	16	16	22
86	22	21	24	22	4	2	5	6	12	9	19	21	17	23
	19	23	22	21	9	2	5	3	6	7	10	16	12	19
	24	19	23	22	7	8	16	29	28	16	19	24	23	21
	26	24	19	23	15	13	17	24	21	19	20	22	23	24
93	67	65	75	69	14	2	3	4	8	6	12	7	7	21
	62	64	61	62	27	0	0	2	8	11	16	16	24	16
	57	87	54	66	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	66	78	54	66	21	0	2	10	10	21	16	16	15	30
	69	56	58	61	20	6	8	8	28	39	23	12	9	20

$\bar{x}$: arithmetischer Mittelwert der spike-wave Komplexe 3 min vor den einzelnen Diazepam-Gaben

Hund Nr. 77 (Abb. 16)

Nach der 1. Diazepam-Gabe (0,25 mg/kg) zeigte sich eine deutliche Reduzierung der spike-wave Komplexe um 61,9 %. Im 2. Versuchsabschnitt lag der Reduktionswert nur noch bei 7,7 %. Die Diazepam- und NDD-Plasmakonzentrationen lagen hierbei höher als im 1. Versuchsteil. Nach der Verdopplung der Diazepam-Konzentrationen auf 0,5 mg/kg bei der 3. Gabe zeigte sich nochmals eine geringe Diazepamwirkung mit einer 24,2 %igen Reduktion der spike-wave Komplexe. Im 4. Versuchsabschnitt (0,5 mg/kg) ließ sich ein völliger Wirkungsverlust feststellen. Die Schwankungsbereiche der spike-wave Komplexe nach der 4. Diazepam-Injektion entsprachen in etwa der Streuung im 3min-Vorlauf. Die PTZ-Plasmakonzentrationen lagen zwischen 15,6 und 17,9 µg/ml.

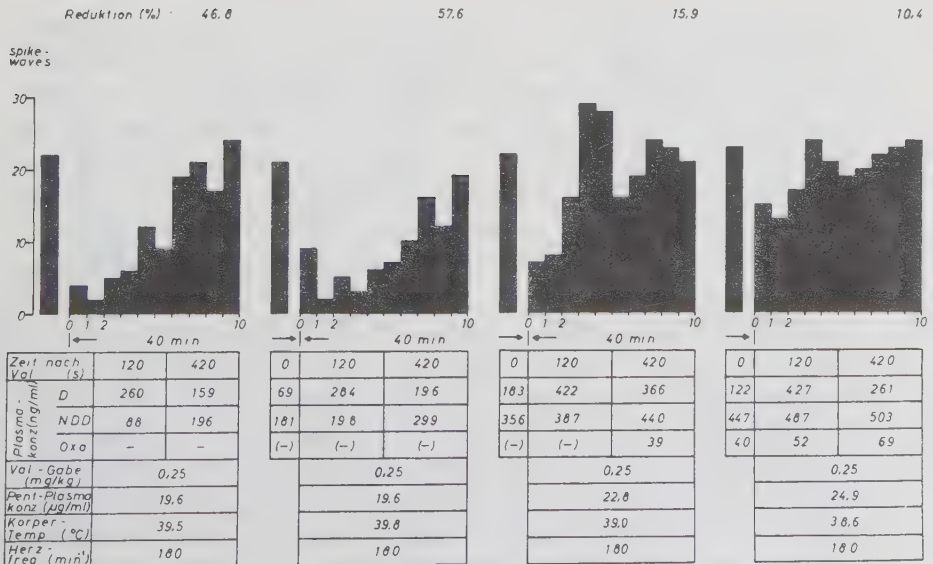
Abb. 16: Graphische Darstellung der spike-wave Komplexe 3 min vor und 10 min nach jeder Gabe von Diazepam (2 x 0,25 mg/kg, 2 x 0,5 mg/kg) bei Hund Nr. 77. Der arithmetische Mittelwert ($\bar{x}$) aus dem 3min-Vorlauf ist als allein stehende Säule dargestellt. Der Reduktionswert (%) ist oberhalb der Säulendiagramme angegeben. Die PTZ-Bolusdosis und die PTZ-Infusionsgeschwindigkeit lagen bei 17 mg/kg bzw. 11 mg/kg/h. Die weiteren Ergebnisse des Versuches sind unterhalb der Säulendiagramme dargestellt.



Hund Nr. 86 (Abb. 17)

Bei diesem Hund wurde 4 mal mit 0,25 mg/kg Diazepam behandelt. Der zeitliche Abstand der Injektionen betrug 40 min. Es zeigte sich nach der 2. Diazepam-Gabe eine Verstärkung der Wirkung von 46,8 auf 57,6 %. Im 3. und 4. Versuchsabschnitt konnte trotz zunehmenden Diazepam- und NDD-Plasmakonzentrationen eine Abnahme der Wirkung auf 15,9 bzw. 10,4 % festgestellt werden.

Abb. 17: Graphische Darstellung der spike-wave Komplexe 3 min vor und 10 min nach jeder Gabe von Diazepam (4 x 0,25 mg/kg) bei Hund Nr. 86. Der arithmetische Mittelwert ($\bar{x}$) aus dem 3min-Vorlauf ist als alleinstehende Säule dargestellt. Der Reduktionswert (%) ist oberhalb der Säulendiagramme angegeben. Die PTZ-Bolusdosis und die PTZ-Infusionsgeschwindigkeit lagen bei 18 mg/kg bzw. 11 mg/kg/h. Die weiteren Ergebnisse des Versuches sind unterhalb der Säulendiagramme dargestellt.



3.2.2.6. Ergebnisse der Versuche mit NDD

Die graphische Darstellung der Versuchsergebnisse (Abb. 18 - 20) erfolgte entsprechend den Diazepam-Versuchen. Auffallend war, daß nach der 1 min dauernden NDD-Applikation über einen längeren Zeitraum keine spike-wave Komplexe auftraten. Die Reduktion lag innerhalb der ersten 10 min nach der NDD-Gabe bei jedem Versuchsabschnitt annähernd bei 100 %. Aus diesem Grund wurde der Zeitpunkt des Wiederauftretens erster spike-wave Komplexe im oberen Teil eines Kästchens oberhalb der Säulendiagramme in Minuten und Sekunden angegeben. Zu diesen Zeitpunkten wurden aus dem 480 sec-NDD-Wert und der NDD-Plasmakonzentration zum Zeitpunkt "0" der darauffolgenden NDD-Gabe die entsprechenden NDD-Plasmakonzentrationen interpoliert. Diese Werte wurden unterhalb der Zeitangaben für das Wiedereinsetzen von spike-wave Komplexen eingetragen.

Bei den Versuchen mit NDD zeigte sich, daß mit dem Einsetzen einer erhöhten elektrophysiologischen Aktivität nach dem Unterschreiten einer bestimmten NDD-Plasmakonzentration gerechnet werden konnte. Dieser Wert lag für alle 3 Versuche zwischen 580 und 860 ng/ml. Bei Hund Nr. 92 waren nach der 2. NDD-Gabe über einen Zeitraum von 90 min keine spike-waves auf dem EEG zu erkennen, und es wurde an eine Wirkungsverstärkung wie bei Hund Nr. 93 gedacht. Es wurde daraufhin eine Erhöhung der PTZ-Infusionsgeschwindigkeit auf 15 mg/kg/h vorgenommen. Zusätzlich erfolgte die Injektion von 6 mg/kg PTZ (5 % PTZ-Lösung, Bolus-Anteil). Es zeigte sich noch während dieser Injektion ein erneutes Auftreten von spike-wave Komplexen auf dem EEG. Wie sich nach der gaschromatographischen Untersuchung der Blutproben herausstellte, wäre es durchaus möglich gewesen, daß die volle NDD-Wirkung über einen so langen Zeitraum hätte bestehen können. Die NDD-Plasmakonzentration lag nach der oben beschriebenen Berechnung nach 90 min bei 690 ng/ml.

Abb. 18: Ergebnisse zum Versuch mit Hund Nr. 87 (3 x 0,5 mg/kg und 1 x 1,0 mg/kg NDD)

Auf der Ordinate ist die Anzahl der spike-wave Komplexe aufgetragen, die in Form eines Säulendiagramms dargestellt wurde. In den Kästchen oberhalb der Diagramme sind die Zeitpunkte für das Wiedereinsetzen von spike-wave Komplexen nach den einzelnen NDD-Injektionen in Minuten und Sekunden dargestellt. Im unteren Teil dieser Kästchen sind die dazugehörigen NDD-Plasmakonzentrationen eingetragen. Sie berechneten sich aus dem 480sec NDD-Wert und der Plasmakonzentration der nachfolgenden NDD-Injektion zum Zeitpunkt "0". Für die letzte NDD-Injektion wurde dieser Wert aus den NDD-Plasmakonzentrationen bei 180 und 480 sec interpoliert. Die PTZ Bolusdosis und die PTZ-Infusionsgeschwindigkeit lagen bei 19 mg/kg bzw. 11 mg/kg/h. Die weiteren Parameter und Ergebnisse sind unterhalb der Säulendiagramme dargestellt.

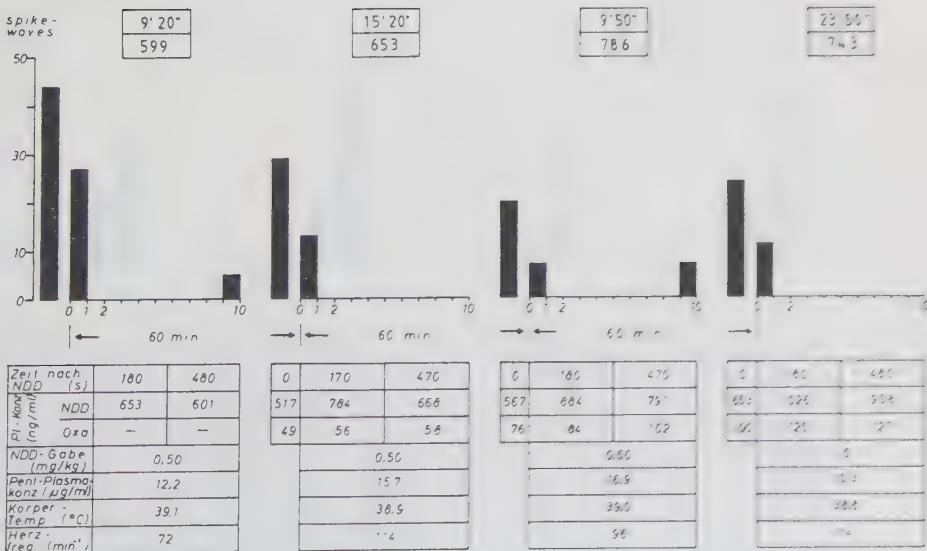


Abb. 19: Ergebnisse zum Versuch mit Hund Nr. 90 (4 x 0,5 mg/kg NDD) (weitere Erklärung siehe Text zu Abb. 18)

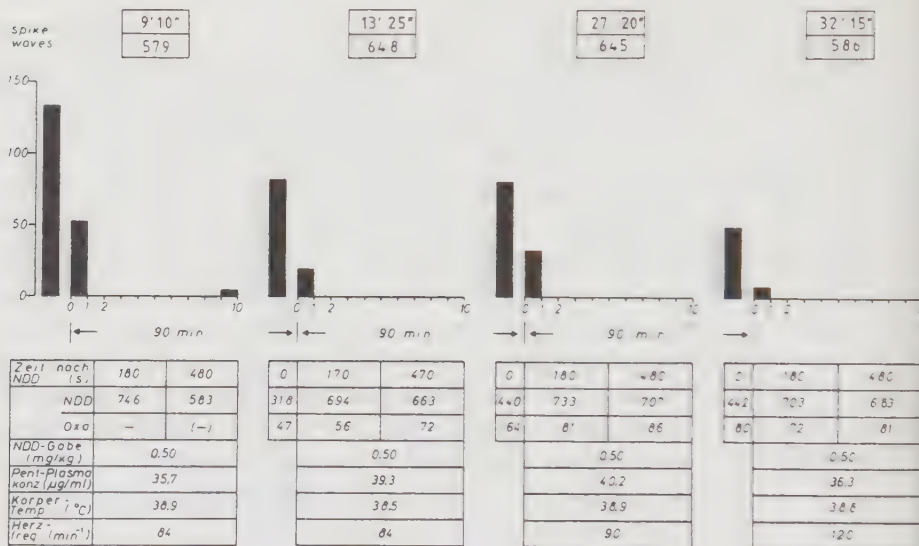
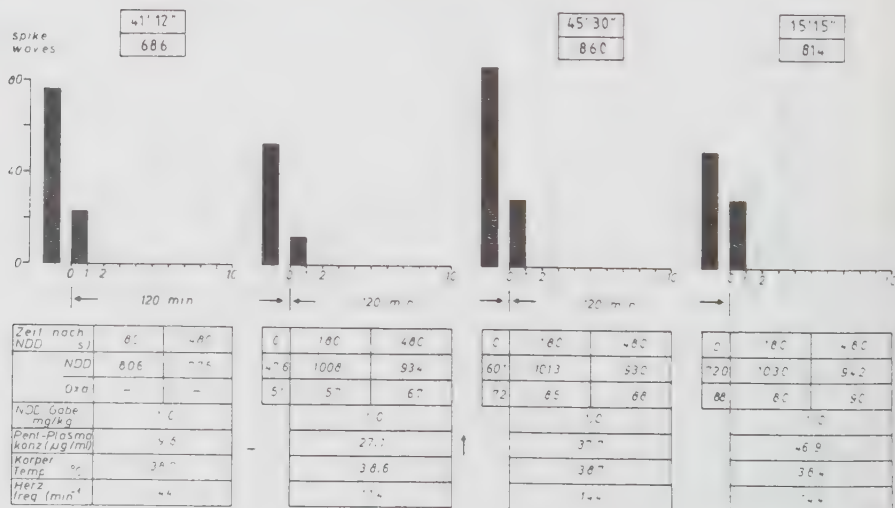


Abb. 20: Ergebnisse zum Versuch mit Hund Nr. 92 (4 x 1,0 mg/kg NDD) (weitere Erklärung siehe Text zu Abb. 18)



↑ : Erhöhung der PTZ-Infusionsgeschwindigkeit von 11 auf 15 mg/kg/h und zusätzliche Gabe von 6 mg/kg PTZ (Bolus-Anteil)

3.2.3. Vergleich der PTZ-Plasma- und Liquorkonzentrationen

Diese Untersuchung wurde bei 2 Hunden, die zur Auswertung nicht herangezogen werden konnten, durchgeführt.

Der eine (Nr. 78) entwickelte frühzeitig eine Hyperthermie und der Blutdruck fiel stark ab, bei dem anderen (Nr. 91) kam es trotz erheblich erhöhter PTZ-Infusionsgeschwindigkeiten nicht zum Auftreten eines auswertbaren EEG. Bei beiden Hunden wurden wiederholt Blut- und Liquorproben entnommen und die PTZ-Konzentrationen darin bestimmt. Tab. 9 zeigt die gute Übereinstimmung der in beiden Körperflüssigkeiten bestimmten Konzentrationen.

Tab. 9: Vergleich der Konzentrationen von PTZ in Plasma und Liquor (ug/ml)

Hund Nr.	91	78
Plasma-konz.	11,1 15,0	35,7 52,6 77,4 83,9
Liquor-konz.	9,8 13,1	38,9 53,5 78,6 81,0

4. DISKUSSION

Subakute Behandlung

Bei allen mit Diazepam und Diazepam/Chlorazepat behandelten Hunden konnte nach 1 bzw. 2 Wochen Behandlungsdauer eine Abnahme der Krampfschwellen festgestellt werden, d.h., es zeigte sich eine Toleranz.

Ein Vergleich der zum Zeitpunkt "0" (vor der jeweiligen Diazepam-Injektion) und 15 min danach bestimmten Plasmakonzentrationen ergab keinen Anhalt für eine beschleunigte Inaktivierung durch Enzyminduktion. Die Resultate bei Hund Nr. 73 deuten eher auf die von Klotz et al. (1976b, 1981) beschriebene Hemmung der Biotransformation von Diazepam in Gegenwart hoher Konzentrationen NDD hin: Während es am Tag 8 nach Injektion von 0,5 mg/kg Diazepam i.v. zu einem Anstieg der Diazepam-Konzentration um 270 ng/ml nach 15 min kam, belief sich der Anstieg am Tag 15 in Anwesenheit von 800 ng/ml NDD auf 400 ng/ml, war also etwa 1,5fach stärker ausgeprägt. Das Auftreten einer Toleranz bzw. eine Verstärkung einer bestehenden Toleranz, könnte bei diesem Versuchsablauf auch durch das "Kindling-Phänomen" erklärt werden. Darunter versteht man eine Abnahme der PTZ-Krampfschwelle bei wiederholter Pentetrazol-Exposition. Die Krämpfe werden dabei heftiger und länger anhaltend. Dieses Phänomen wurde bei täglichen PTZ-Gaben bei Ratten durch Ito et al. (1977) und an Hunden bei wiederholter PTZ-Applikation im Zeitraum von 11 Tagen durch Löscher (1983) beschrieben. Eine "Toleranzentwicklung" auf Grund des "Kindling-Phänomens" wurde durch einen Vorversuch ausgeschlossen. Hierzu wurden 4 Krampfschwellen-Bestimmungen mit PTZ im Abstand von einer Woche durchgeführt. Es zeigte sich, daß die Krampfschwelle dabei unverändert blieb. Nach dem Ausschluß einer Enzyminduktion und des "Kindling-Phänomens" blieben für die Erklärung der experimentell erzeugten Toleranz noch funktionelle Ursachen übrig.

Hierbei könnten die eingangs beschriebenen Änderungen von Rezeptor-Eigenschaften eine entscheidende Rolle spielen. Inwieweit es dabei zu Änderungen von Affinitäten oder aber zu Ände-

rungen in der maximalen Bindungskapazität kommt, kann nach den vorliegenden Versuchen nicht beurteilt werden. Beide Mechanismen scheinen aber auch zusammen aufzutreten, sowohl am Benzodiazepin- wie auch am GABA-Rezeptor. Ein Zusammenhang beider Systeme bei der Vermittlung der antikonvulsiven Wirkung wird vermutet.

Eine Abnahme der maximalen Bindungskapazität (B_{max}) der Benzodiazepin-Rezeptoren nach Benzodiazepin-Gabe (Crawley et al. 1982) wurde durch einen Anstieg der Zahl der GABA-Bindungsstellen kompensiert (Marangos und Crawley 1982). Möglicherweise kann der Ausfall dieses von Marangos und Crawley beschriebenen Mechanismus als Ursache der funktionellen Toleranz bei subakuter Behandlung angesehen werden.

Weiterhin kann auf Grund dieser Untersuchung nicht beurteilt werden, inwieweit kumulative Vorgänge im Gehirn, sowohl für Diazepam, als auch für NDD und Oxazepam, bei der Entstehung der Toleranz ursächlich beteiligt sind. Einen besseren Anhaltspunkt dafür würde die Untersuchung von Liquorproben liefern. Aber auch sie gibt keine genaue Auskunft über die Konzentrationen der Benzodiazepine an ihrem Wirkungsort.

Aus den Plasmakonzentrationen abgeleitet, scheint der von Barnett und Fiore (1971, 1973) und der von Elsass et al. (1980) angeführte Mechanismus für die Erklärung der Toleranz nicht ausreichend. So konnte bei Hund Nr. 83 eine Erniedrigung der Krampfschwelle am Behandlungsende auf den Wert vor Behandlungsbeginn gezeigt werden, obwohl die Diazepam-Konzentration gegenüber der ersten Krampfschwellenbestimmung nur geringfügig gefallen war, und die NDD-Konzentration sich von 200 auf 420 ng/ml etwa verdoppelt hatte. Selbst bei vollständiger Verdrängung von Diazepam vom Benzodiazepin-Rezeptor durch NDD hätte auf Grund der antikonvulsiven Eigenwirkung von NDD noch mit einer erhöhten Krampfschwelle gerechnet werden können. Bei den Hunden Nr. 64 und Nr. 78 blieben die NDD-Konzentrationen an den Tagen der Krampfschwellenbestimmung konstant (Hund Nr. 64) oder fielen sogar (Hund Nr. 78) bei leicht fallenden (Nr. 64) oder steigenden (Nr. 78) Diazepam-Konzentrationen. In beiden Versuchen ging die antikonvulsive Wirkung vollständig verloren, eine Erklärung im Sinne der Hypothese von Barnett und Fiore scheint nicht möglich. Die genannte Hypothese wäre ledig-

lich als Erklärung für den partiellen Wirkungsverlust bei den Hunden Nr. 73 und 91, die sehr hohe NDD-Konzentrationen aufwiesen, plausibel gewesen.

Für die Versuche bei subakuter Behandlung mit NDD wurde eine Korrelation zwischen der aktuellen NDD-Plasmakonzentration und der Höhe der Krampfschwelle gezeigt, d.h., daß bei ausschließlicher NDD-Behandlung keine Toleranz festgestellt werden konnte. Dieses Ergebnis deckt sich mit den Befunden der Untersuchung von Barnett und Fiore (1971, 1973) und weiterhin mit den Ergebnissen von Elsass et al. (1980). Allerdings beschrieben diese Autoren das Fehlen der Toleranz gegenüber der muskelrelaxierenden bzw. anxiolytischen Wirkung von NDD.

Aus dem oben gezeigten Zusammenhang der NDD-Plasmakonzentration mit der Höhe der Krampfschwelle (Tab. 7), läßt sich weiterhin vermuten, daß die Konzentrationen von NDD sich in Plasma und Gehirn parallel verändern.

Für die subakute Behandlung kann zusammengefaßt werden:

1. eine Toleranzentwicklung gegenüber der antikonvulsiven Wirkung von Diazepam wurde experimentell bereits nach 1 Woche Behandlungsdauer nachgewiesen. Diese Toleranz wird als "funktionell" angesehen, wahrscheinlichste Erklärung sind Veränderungen auf der Rezeptor-Ebene.
2. Bei ausschließlicher NDD-Behandlung konnte keine Toleranz gegenüber der antikonvulsiven Wirkungsqualität von NDD gezeigt werden.

Das Verhältnis der antikonvulsiven Wirkungsstärke von Diazepam gegenüber NDD wurde aus den vorliegenden Hunderversuchen mit $1 : 0,27$ berechnet. Erwähnt werden muß in diesem Zusammenhang die Schwierigkeit bei der Berechnung der Diazepamwirkung in Anwesenheit von NDD. NDD zeichnet sich durch eine hohe Affinität zum Benzodiazepin-Rezeptor aus, die nach Möhler (zit. Frey und Löscher 1982) mit $0,86$ gegenüber $1,0$ für Diazepam angegeben wurde. Gleichzeitig besitzt NDD eine geringe "intrinsic activity" (partieller Agonist/Antagonist). Das berechnete Wirkungsverhältnis deckt sich aber gut mit den Angaben von Frey und Löscher (1982), die bei ihren Untersuchungen an Mäusen ein Wirkungsverhältnis von $1,0 : 0,26$ angaben.

Akute Behandlung

Mit dem verwendeten PTZ-Infusions-Modell war es möglich experimentell einen Status epilepticus hervorzurufen. Damit zusammenhängend konnten im EEG elektrophysiologische Veränderungen aufgezeichnet werden, die in Form von spike-wave Komplexen und spikes ohne Nachschwankungen auftraten. Es zeigte sich, daß nach der Einstellung eines steady-state die spike-wave Komplexe konstant auftraten. Auf dieser Grundlage war es möglich, daß neben einer qualitativen Aussage auch quantitative Angaben über die Wirkungsdauer und -stärke im Einzelversuch gemacht werden konnten.

Versuche mit Diazepam

Bei den 6 Versuchen zum Nachweis einer akuten Toleranz gegenüber der antikonvulsiven Wirkungsqualität von Diazepam beim Hund ist es in 2 Fällen (Nr. 77, Nr. 86) gelungen, eine akute Toleranz nachzuweisen. Es zeigte sich hierin eine Parallelität zur Klinik. Auch dort wird die akute Toleranz nur relativ selten beschrieben. Für die Erklärung der Ursachen der akuten Toleranz können folgende Punkte herangezogen werden:

1. hohe Pentetrazol-Plasmakonzentrationen:

Es zeigte sich bei den Versuchen in denen der Nachweis der akuten Toleranz gelungen ist, daß für PTZ ein steady-state erreicht wurde, und daß die PTZ-Plasmakonzentrationen unterhalb der Konzentrationen der Versuche ohne Toleranzentwicklung lagen. Es scheiden daher hohe PTZ-Plasmakonzentrationen zur Erklärung der akuten Toleranz aus. Weiterhin können ansteigende PTZ-Plasmakonzentrationen während der Versuchsdauer und damit eventuell verbunden ein früheres und vermehrtes Auftreten von spike-wave Komplexen nach den Diazepam-Injektionen als Ursache ausgeschlossen werden.

2. Beziehung zur Diazepam-Plasmakonzentration:

Die akute Toleranz kann nicht durch fallende Diazepam-Konzentrationen, etwa als Folge einer beschleunigten Biotransformation, erklärt werden. So zeigte sich das Phänomen der akuten

Toleranz im Versuch mit Hund Nr. 77 bei Diazepam-Plasmakonzentrationen von über 1 µg/ml, und bei Hund Nr. 86 lagen die Diazepam-Konzentrationen nach der 3. und 4. Diazepam-Injektion in einem Bereich, der auch in Versuchen ohne Toleranzentwicklung gefunden wurde. Daraus ergibt sich, daß zwischen dem Auftreten der akuten Toleranz und den Diazepam-Plasmakonzentrationen kein Zusammenhang bestand. Eine Korrelation zwischen der Diazepam-Plasmakonzentration und der prozentualen Reduktion der spike-wave Komplexe konnte auch in den Versuchen ohne Toleranz nicht gezeigt werden, obwohl diese Aussage durch die Anwesenheit der aktiven Metaboliten von Diazepam, NDD und Oxazepam, erschwert wird.

3. hohe Relationen NDD/Diazepam:

Nach der Barnett-Fiore'schen Hypothese läßt sich die akute Toleranz durch eine Verdrängung von Diazepam durch kumulierendes NDD vom Benzodiazepin-Rezeptor erklären. Ein Vergleich der Verhältnisse der NDD-Plasmakonzentrationen zu den Konzentrationen von Diazepam zwischen den Versuchen ohne und mit Toleranz lieferte keine Hinweise für die Richtigkeit dieser Hypothese, d.h., daß die Barnett-Fiore'sche Hypothese auf Grund der Ergebnisse dieser Versuche als Ursache der akuten Toleranz ausscheidet.

4. unterschiedliche spike-wave Frequenzen im EEG:

Beim Vergleich der spike-wave Frequenzen im EEG vor den ersten Diazepam-Injektionen konnten keine Anhaltspunkte zur Erklärung der akuten Toleranz gefunden werden. Es zeigte sich bei den Hunden Nr. 77 und Nr. 86 (Toleranz) eine gute Übereinstimmung der Anzahl der spike-wave Komplexe mit denen der Hunde Nr. 83 und Nr. 84 (keine Toleranz). Weiterhin blieben die spike-wave Frequenzen vor den 4 bzw. 5 Diazepam-Injektionen innerhalb der einzelnen Versuche konstant.

5. Körpertemperatur

Als weitere mögliche Ursache für die akute Toleranz können Schwankungen der Körpertemperaturen oder stark erhöhte Körpertemperaturen angeführt werden. Bei den beiden Hunden, bei denen eine akute Toleranz gefunden wurde, lag die Körpertemperatur zwar über 39°C, sie unterschied sich aber nicht von derjenigen bei Hund Nr. 75, bei dem keine Toleranz auftrat.

So muß bei der Erklärung der Ursache für die akute Toleranz auf zentrale Adaptationsvorgänge verwiesen werden, die wahrscheinlich auf Rezeptor-Ebene zu suchen sind. Auf der Grund-

lage der durchgeführten Untersuchungen kann über den Mechanismus der zentralen Veränderungen und der damit wahrscheinlich in Zusammenhang stehenden Ursache der akuten Toleranz keine Aussage getroffen werden.

Versuche mit NDD

Bei den Versuchen mit NDD konnten keine Anzeichen für eine akute Toleranz gefunden werden; dies könnte aber seine Erklärung in der kleinen Zahl der mit diesem Stoff durchgeführten Versuche finden. Es zeigte sich bei allen drei Hunden eine gute Parallelität zwischen der NDD-Plasmakonzentration und der Wirkung im EEG. So konnte nach den NDD-Injektionen eine vollständige Unterdrückung der spike-wave Aktivität bei NDD-Konzentrationen über 600 - 800 ng/ml beobachtet werden. Auffallend war bei diesen Versuchen die deutlich längere, und bei 3 - 4fach höheren NDD-Plasmakonzentrationen, die dem Dosis-Verhältnis Diazepam : NDD = 1,0 : 3,7 entsprachen (siehe 3.2.1.5.), auch intensivere Wirkung von NDD. Bisher liegen keine klinischen Erfahrungen mit NDD vor. Auf Grund der Ergebnisse dieser Versuche wäre ein Einsatz von NDD im Status epilepticus zu erwägen, obwohl bei intravenöser Injektion von Chlorazepat die Umwandlung zu NDD langsamer erfolgt, als nach intravenöser Applikation von Diazepam (Bertler et al. 1983).

5. ZUSAMMENFASSUNG

Am Hund wurden Versuche zum experimentellen Nachweis der Toleranz und akuten Toleranz gegenüber der antikonvulsiven Wirkung von Diazepam und N-Desmethyldiazepam durchgeführt.

Zum Nachweis der Toleranz wurden 4 Versuchsreihen an je 3 bzw. 4 Hunden durchgeführt. Es wurde 2 mal ausschließlich mit Diazepam behandelt (Tagesdosen 3 x 0,25 mg/kg bzw. 3 x 0,5 mg/kg), einmal eine kombinierte Behandlung mit Diazepam und Chlorazepat (0,5 mg/kg i.v., 3 x 1 mg/kg) und einmal eine ausschließliche NDD-Behandlung durchgeführt (Tagesdosen 3 x 2 mg/kg Chlorazepat). Es zeigte sich bei allen mit Diazepam behandelten Tieren nach einer Behandlungswoche das Auftreten einer Toleranz, die sich in einer Abnahme der Pentetrazol-Krampfschwelle äußerte. Eine Enzyminduktion ist als Ursache wenig wahrscheinlich. Bei den mit NDD behandelten Hunden zeigte sich eine enge Korrelation zwischen der NDD-Plasmakonzentration und der Höhe der Krampfschwelle, d.h., es ließ sich keine Toleranz nachweisen.

In den Versuchen zum Nachweis einer akuten Toleranz wurden mit Hilfe eines PTZ-Infusionsmodells an narkotisierten, relaxierten und beatmeten Hunden charakteristische und konstante Veränderungen im EEG hervorgerufen, auf deren Grundlage die Wirkung von Diazepam und NDD ausgewertet wurde. Bei den Versuchen mit Diazepam erfolgten im 40 bzw. 60min Abstand 4 - 5 intravenöse Injektionen (0,25 mg/kg, 0,5 mg/kg). Bei 2 von 6 Hunden ließ sich eine akute Toleranz nachweisen. Eine Erklärung für die Entwicklung der akuten Toleranz bei diesen beiden Hunden konnte aus den registrierten Daten nicht gewonnen werden, wahrscheinlich sind Veränderungen auf der Rezeptor-Ebene ursächlich verantwortlich. Bei den 3 Versuchen mit NDD wurden 4 NDD-Injektionen im 60, 90 bzw. 120 min Abstand verabreicht (0,5 mg/kg, 1,0 mg/kg). Ein enger Zusammenhang zwischen der NDD-Plasmakonzentration und der Wirkung im EEG konnte gezeigt werden. Eine akute Toleranz gegenüber NDD entwickelte sich nicht.

Beim Vergleich der antikonvulsiven Wirkungsstärke von Diazepam gegenüber NDD ließ sich aus den Krampfschwellenversuchen ein Verhältnis von 1,0 : 0,27 berechnen.

Summary

Experiments were done in dogs in order to show the development of tolerance and acute tolerance to the anticonvulsant effect of diazepam.

In order to show the development of tolerance, 4 groups of dogs, each consisting of 3 or 4 dogs, were used. Treatment was with diazepam, 0.25 or 0.5 mg/kg t.i.d., or with chlorazepate, 2 mg/kg t.i.d.. At the start of the experiment and then at weekly intervals, the convulsive threshold for pentetrazole was determined. Already after 1 week's treatment, the acute anticonvulsant effect of diazepam (0.25 or 0.5 mg/kg i.v.) was diminished or even absent. This was also the case, when the dogs were treated with chlorazepate, between the threshold determinations with diazepam.

However, no tolerance developed to the anticonvulsant effect of NDD in dogs only treated with chlorazepate.

From these experiments an anticonvulsant potency ratio of 1 : 0.27 could be calculated for diazepam and NDD.

Experiments to show an acute tolerance were performed in dogs anesthetized and completely relaxed, in which spike-wave activity in the EEG was maintained by an infusion of pentetrazole. In 6 experiments 4 - 5 injections of diazepam (0.25 - 0.5 mg/kg) were given at intervals of 40 - 60 min. Only 2 of these dogs developed an acute tolerance to the effect of diazepam on the EEG spike-wave activity. An explanation was not possible from the data recorded or determined during the experiments, so that changes at the receptor level must be assumed as causative. In 3 experiments in which NDD was used instead of diazepam, no acute tolerance developed.

6. LITERATURVERZEICHNIS

1. Barnett, A., Fiore, J.W.: Acute tolerance to diazepam in cats and its possible relationship to diazepam metabolism.
Europ. J. Pharmacol. 13, 239-243 (1971)
2. Barnett, A., Fiore, J.W.: Acute tolerance to diazepam in cats.
In: Garattini, S., Mussini, E., Randall, L.O.: The Benzodiazepines, S. 545-557, Raven Press New York (1973)
3. Baxter, C.F., Roberts, E.: Demonstration of thiosemicarbazide-induced convulsions in rats with elevated brain levels of gammaaminobutyric acid.
Proc. Soc. exp. Biol. Med. 104, 426-427 (1960)
4. Bellantuono, C., Reggi, V., Tognoni, G., Garattini, S.: Benzodiazepines: Clinical pharmacology and therapeutic use.
Drugs 19, 195-219 (1980)
5. Bergamini, L., Utani, R., Fariello, R., Liboni, W.: Elektroenzephalographische und klinische Bewertung des neuen Benzodiazepin Ro 5/4023.
EEG/EMG 1, 182-188 (1970)
6. Bertler, A., Lindgren, S., Magnusson, J.-O., Malmgren, H.: Pharmacokinetics of chlorazepate after intravenous and intramuscular administration.
Psychopharmacology 80 236-239 (1983)
7. Bignami, A., Palladini, G., Venturini, G.: Effect of car-diazol on sodium-potassium-activated adenosine triphosphatase of the rat brain in vivo.
Brain Res. 1, 413-414 (1966)

8. Bochner, F., Carruthers, G., Kampmann, J., Steiner, J.:
Handbook of Clinical Pharmacology
Little, Brown and Comp., Boston, 155-158 (1978)
9. Braestrup, C., Nielsen, M., Squires, R.F.: No changes in
rat benzodiazepine receptors after withdrawal
from continuous treatment with lorazepam and
diazepam.
Life Sci. 24, 347-350 (1979)
10. Brown, D., Stone, W.E.: Effects of convulsants on cortical
adenosine triphosphatase.
J. Neurochem. 20, 1461-1467 (1973)
11. Browne, T.R., Penry, J.K.: Benzodiazepines in the treat-
ment of epilepsy. A review.
Epilepsia 14, 277-310 (1973)
12. Browne, T.R.: Clonazepam. A review of a new anticonvul-
sant drug.
Arch. Neurol. 33, 326-332 (1976)
13. Chiu, T.H., Rosenberg, H.C.: Reduced diazepam binding
following chronic benzodiazepine treatment.
Life Sci. 23, 1153-1158 (1978)
14. Chiu, T.H., Rosenberg, H.C.: GABA receptor-mediated modu-
lation of [³H]diazepam binding in rat cortex.
Europ. J. Pharmacol. 56, 337-345 (1979)
15. Consolo, S., Garattini, S., Ladinsky, H.: Action of the
benzodiazepines on the cholinergic system.
Adv. Biochem. Psychopharmacol. 14, 63-80
(1975)
16. Corrodi, H., Fuxe, K., Lidbrink, P., Olson, L.: Minor
tranquilizers, stress and central catecholamine
neurons.
Brain Res. 29, 1-16 (1967)

17. Costa, E., Guidotti, A., Mao, C.C., Suria, A.: New concepts on the mechanism of action of benzodiazepines.
Life Sci. 17, 167-186 (1975)
18. Costa, E.: The role of gammaaminobutyric acid in the action of 1,4- benzodiazepines.
TIPS 1, 41-44 (1979)
19. Crawley, J.N., Marangos, P.J., Stivers, J., Goodwin, F.K.: Chronic clonazepam administration induces benzodiazepine receptor subsensitivity.
Neuropharmacology 21, 85-89 (1982)
20. David, R.J., Wilson, W.A., Escueta, A.V.: Voltage clamp analysis of pentylenetetrazol effects on Aplysia neurons.
Brain Res. 67, 549-554 (1974)
21. De Robertis, E., Alberici, M., Rodriguez de Lores, G.: Astroglial swelling and phosphohydrolases in cerebral cortex of Metrazol convulsant rats.
Brain Res. 12, 461-466 (1969)
22. De Silva, J., Koechlin, B.A., Bader, G.: Blood level distribution patterns of diazepam and its major metabolite in man.
J. pharm. Sci. 55, 692-702 (1966)
23. Distefano, P., Case, K.R., Colello, G.D., Bosmann, H.B.: Increased specific binding of [³H]diazepam in rat brain following chronic diazepam administration.
Cell. Biol. Intern. Rep. 3, 163 (1979)
24. Dolce, G., Kaemmerer, E.: Neurophysiological studies with 7-chlor-1,3-dihydro-3-hydroxy-5-phenyl-2H-1,4-benzodiazepin-2-on in animal experiments.
Arzneim. Forsch. 17, 1057-1060 (1967)

25. Doteuchi, M., Costa, E.: Pentylenetetrazol convulsions and brain catecholamine turnover rate in rats and mice receiving diphenylhydantoin or benzo-diazepines.
Neuropharmacology 12, 1059-1072 (1973)
26. Ducreux, C., Takeuchi, H., Chalazonitis, N.: Depolarisation paroxysmale du soma et decharges axoniques d'un meme neurone traite au Metrazol (neurones auto-actif d'Helix).
C.R. Acad. Sci. D. (Paris) 275, 1907-1909 (1972)
27. Dumermuth, G., Kovacs, E.: Die Wirkung von Clonazepam in der peroralen Langzeittherapie schwerer Epilepsieformen des Kindesalters.
Schweiz. med. Wschr. 104, 608-617 (1974)
28. Ehlert, F.J., Roeske, W.R., Yamamura, H.I.: Multiple benzodiazepine receptors and their regulation by GABA.
Life Sci. 29, 235-248 (1981)
29. Elsass, P., Hendel, J., Hvidberg, E.F., Hansen, T., Gymoese, E., Rathje, J.: Kinetics and neuropsychologic effects of IV Diazepam in the presence and absence of its active N-desmethyl metabolite in humans.
Psychopharmacology 70, 307-312 (1980)
30. Esplin, D.W., Woodbury, D.M.: The fate and excretion of C¹⁴-labelled pentylenetetrazol in the rat, with comments on analytical methods for pentylenetetrazol.
J. Pharmacol. exp. Ther. 118, 129-138 (1956)
31. Faugier-Grimaud, S.: Extrasynaptic mechanisms of Cardiazol-induced epileptiform activity of invertebrate neurons.
Brain Res. 67, 354-360 (1974)

11. Faulster, S., Willows, A.O.C.: Behavioral and nerv cell membrane effects of an epileptic agent (Metrazol) in a mollusk.
Brain Res. 52, 243-260 (1973)
12. File, S.E., Mabbott, P.S.: Tolerance does develop to diazepam's protective effects against pentylene-tetrazol induced seizures.
Brit. J. Pharmacol. 78, 227 (1983)
13. Frey, H.-H.: Dosierung von Succinylcholin beim Hund, Anästhesist 21, 230-231 (1972)
14. Frey, H.-H., Löscher, W.: Anticonvulsant potency of unaltered diazepam.
Pharmacology 25 154-159 (1982)
15. Fuxe, K., Agnati, L.F., Solme, P., Mörtzell, T., Lidbrink, P., Lunddahl, A., Perez de la Mora, M., Ögren, S.-O.: The possible involvement of GABA mechanisms in the action of benzodiazepines on central catecholamine neurons.
Adv. Biochem. Pharmacol. 14, 45-61 (1976)
16. Gastaud, H., Roger, J., Job, H.: Le diazepam dans épilepsies chroniques.
Sem. Hop. Paris 43, 401-407 (1967)
17. Gastone, G.C., Booker, H.E., Sato, S.: Brain and serum concentrations of diazepam in experimental epilepsy.
Epilepsia 15, 417-425 (1974)
18. Gelder, A.N. von, Sherwin, A.L., Kasmussen, T.: Amino acid content of epileptogenic human brain: Focal versus surrounding regions.
Brain Res. 40, 355-363 (1972)

48. Juhasz, L., Dairman, W.: Effect of subacute diazepam administration in mice on the subsequent ability of diazepam to protect against metrazol and bicuculline induced convulsions.
Fed. Proc. 36, 377 (1977)
49. Jun, H.W.: Pharmacokinetic studies of pentylenetetrazol in dogs.
J. pharm. Sci 65, 1038-1041 (1976)
50. Kanto, J., Iisalo, E., Lethinen, V., Salminen, J.: The concentration of diazepam and its metabolites in the plasma after an acute and chronic administration.
Psychopharmacologia (Berl.) 36, 123-131 (1974)
51. Kick, H., Dreyer, R.: Klinische Erfahrungen mit Clonazepam unter besonderer Berücksichtigung psychomotorischer Anfälle.
Acta neurol. Scand. 49, Suppl. 53, 54-59 (1973)
52. Killam, E.K., Matsuzaki, M., Killam, K.F.: Effects of chronic administration of benzodiazepines on epileptic seizures and brain electrical activity in *Papio papio*.
In: Garattini, S., Mussini, E., Randall, L.O. (Eds): The Benzodiazepines, S. 443-460, Raven Press New York (1973)
53. Klee, M., Faber, D., Heiss, W.: Strychnine- and pentylenetetrazol-induced changes of excitability in *Aplysia* neurons.
Science 179, 1133-1136 (1973)
54. Kleijn, E. van der, Rossum, J.M. van, Muskens, E.T.J.M., Rijntes, N.V.M.: Pharmacokinetics of diazepam in dogs, mice and humans.
Acta pharmacol. 29, Suppl. 3, 109-127 (1971)

55. Klotz, U., Antonin, K.-H., Bieck, P.R.: Pharmacokinetics and plasma binding of diazepam in man, dog, rabbit, guinea-pig and rat.
J. Pharmacol. exp. Ther. 199, 67-73 (1976a)
56. Klotz, U., Antonin, K.-H., Bieck, P.R.: Comparison of the pharmacokinetics of diazepam after single and subchronic doses.
Europ. J. clin. Pharmacol. 10, 121-126 (1976b)
57. Klotz, U., Reimann, I.: Clearance of diazepam can be impaired by its major metabolite desmethyldiazepam.
Europ. J. clin. Pharmacol. 21, 161-163 (1981)
58. Krogsgaard-Larsen, P., Johnston, G.A.R.: Inhibition of GABA uptake in the rat brain slices by nipecotic acid, various isoxazoles and related compounds.
J. Neurochem. 25, 797-802 (1975)
59. Kruse, R., Blankenhorn, V.: Zusammenfassender Erfahrungsbericht über die klinische Anwendung und Wirksamkeit von Ro 5/4023 (Clonazepam) auf verschiedene Formen epileptischer Anfälle.
Acta neurol. Scand. 49, Suppl. 53, 60-71 (1973)
60. Lipka, A.S., Regan, B.: Additional studies on the importance of glycine and GABA in mediating the actions of benzodiazepines.
Life Sci. 21, 1779-1784 (1977)
61. Lloyd, K.G., Munari, C., Bossi, L., Bancaud, J., Talairach, J., Morselli, P.L.: Biochemical evidence for the alterations of GABA-mediated synaptic transmission in human epileptic foci.
In: Lloyd, K.G., Löscher, W., Meldrum, B.S., Morselli, P.L. (Eds): Neurotransmitters, Seizures and Epilepsy, Raven Press New York (1981)

62. Löscher, W.: Alterations in CSF GABA levels and seizure susceptibility developing during repeated administration of pentetrazole in dogs. Effects of γ -acetylenic GABA, valproic acid and phenobarbital. *Neurochem. Int.* 5, 405-412 (1983)
63. Löscher, W., Frey, H.-H.: Pharmacokinetics of diazepam in the dog. *Arch. int. Pharmacodyn.* 254, 180-195 (1981)
64. Löscher, W., Rating, D., Siemes, H.: GABA in cerebrospinal fluid of children with febrile convulsions. *Epilepsia* 22, 697-702 (1981)
65. Macdonald, R.L., Barker, J.L.: Penicillin and pentylenetetrazol selectively antagonize GABA-mediated postsynaptic inhibition of cultured mammalian neurons. *Neurology (Minneapolis)* 27, 337 (1977)
66. Maggi, A., Satinover, J., Oberdorfer, M., Mann, E., Enna, S.J.: Phylogenetic characteristics of muscimol-activated benzodiazepin receptor binding. *Brain Res. Bull.* 5, Suppl. 2, 167-171 (1980)
67. Mandelli, M., Tognoni, G., Garattini, S.: Clinical pharmacokinetics of diazepam. *Clin. Pharmacokin.* 3, 72-91 (1978)
68. Manyam, N.V.B., Katz, L., Hare, T.A., Gerber, J.C., Grossman, M.H.: Levels of γ -aminobutyric acid in cerebrospinal fluid in various neurologic disorders. *Arch. Neurol.* 37, 352-355 (1980)

69. Marangos, P.J., Crawley, J.N.: Chronic benzodiazepine treatment increases [^3H]muscimol binding in the mouse brain.
Neuropharmacology 21, 81-84 (1982)
70. Marcucci, F., Fanelli, R., Mussini, E., Garattini, S.: Further studies on species difference in diazepam metabolism.
Europ. J. Pharmacol. 9, 253-256 (1969)
71. Marcucci, F., Guaitani, A., Kvetina, J., Mussini, E., Garattini, S.: Species differences in diazepam metabolism and anticonvulsant activity.
Europ. J. Pharmacol. 4, 467-470 (1968)
72. Masland, R.L.: A controlled trial of clonazepam in temporal lobe epilepsy.
Acta neurol. Scand. Suppl. 60, 49-54 (1975)
73. Mattson, R.H.: The benzodiazepines,
In: Woodbury, D.M., Penry, J.K., Schmidt, R.P. (Eds) Antiepileptic Drugs, S. 497-516, Raven Press New York, (1972)
74. Millichap, J.G., Ortiz, W.R.: Nitrazepam in myoclonic epilepsies.
Amer. J. Dis. Child. 112, 242-248 (1966)
75. Mitenko, P., Ogilvie, R.: Rapidly achieved plasma concentration plateaus, with observation on theophylline kinetics.
Clin. Pharmacol. Ther. 13, 329-335 (1972)
76. Möhler, H., Okada, R.: Benzodiazepine receptor: Demonstration in the central nervous system.
Science 198, 849-851 (1977)

77. Möhler, H., Okada, T., Enna, S.J.: Benzodiazepine and neurotransmitter receptor binding in rat brain after chronic administration of diazepam or phenobarbital.
Brain Res. 156, 391-395 (1978)
78. Morselli, P.L.: Psychotropic drugs - Benzodiazepines
In: Morselli, P.L. (Ed.): Drug disposition during development. Spectrum Publications, Inc. New York, Toronto, London, Sydney, S. 449-459 (1977)
79. Morselli, P.L., Cassano, G.B., Placidi, G.F., Muscettola, G.B., Rizzo, M.: Kinetics of the distribution of ^{14}C -diazepam and its metabolites in various areas of cat brain.
In: Garattini, S., Mussini, E., Randall, L.O. (Eds): The Benzodiazepines, Raven Press New York, S. 129-143 (1973)
80. Olsen, R.W.: GABA-benzodiazepine-barbiturate receptor interactions.
J. Neurochem. 37, 1-13 (1981)
81. Parsonage, M.J., Norris, J.: Use of diazepam in the treatment of severe convulsive status epilepticus.
Brit. med. J. III, 85-88 (1967)
82. Paul, S.M., Skolnick, P.: Rapid changes in brain benzodiazepine receptors after experimental seizures.
Science 202, 892-893 (1978)
83. Fellmar, T.C., Wilson, W.A.: Synaptic mechanism of pentylenetetrazol: Selectivity for chlorid conductance.
Science 197, 912-914 (1977)
84. Perry, T.L., Hansen, S., Kennedy, J., Wada, J.A., Thompson, G.B.: Amino acids in human epileptogenic foci.
Arch. Neurol. 32, 752-754 (1975)

85. Pincus, J.H., Giarman, N.J.: The effect of diphenylhydantoin on sodium-, potassium-, magnesium-stimulated adenosine triphosphatase activity of rat brain.
Biochem. Pharmacol. 16, 600-603 (1967)
86. Ramsay, E., Hammond, E.J., Perchalski, R.J., Wilder, J.: Brain uptake of phenytoin, phenobarbital and diazepam.
Arch. Neurol. 36, 535-539 (1979)
87. Rehavi, M., Skolnick, P., Paul, S.: Effects of tetrazole derivatives on [³H]diazepam binding in vitro: Correlation with convulsant potency.
Europ. J. Pharmacol. 78, 353-356 (1982)
88. Rosenberg, H.C., Chiu, T.H.: Tolerance during chronic benzodiazepine treatment associated with decreased receptor binding.
Europ. J. Pharmacol. 70, 453-460 (1981)
89. Rosenberg, H.C., Chiu, T.H.: Nature of functional tolerance produced by chronic flurazepam treatment in the cat.
Europ. J. Pharmacol. 81, 357-365 (1982)
90. Rossi, G.F., di Rocco, C., Maira, G., Meglio, M.: Experimental and clinical studies of the anti-convulsant properties of a benzodiazepine derivative, clonazepam (Ro 5-4023).
In: Garattini, S., Mussini, E., Randall, L.O.: The Benzodiazepines, S. 461-488, Raven Press New York (1973)
91. Rowles, S.G., Born, G.S., Russell, H.T., Kessler, W.V., Christian, J.E.: Biological disposition of pentylenetetrazol-10-¹⁴C in rats and humans.
J. pharm. Sci. 60, 725-727 (1971)

92. Ruelius, H.W., Lee, J.M., Alburn, H.E.: Metabolism of diazepam in dog: Transformation to oxazepam.
Arch. Biochem. Biophys. 111, 376-380 (1965)
93. Salcman, M., Defendini, R., Correll, J., Gilman, S.: Neuropathological changes in cerebellar biopsies of epileptic patients.
Ann. Neurol. 3, 10-19 (1978)
94. Schwartz, M.A., Koechlin, B.A., Postma, E., Palmer, S., Krol, G.: Metabolism of diazepam in rat, dog and man.
J. Pharmacol. exp. Ther. 149, 423-435 (1965)
95. Sellman, R., Kanto, J., Raijola, E., Pekkarinen, A.: Induction effect of diazepam on its own metabolism.
Acta pharmacol. (Kbh.) 37, 345-351 (1975)
96. Sharer, L., Kutt, H.: Intravenous administration of diazepam. Effects on penicillin-induced focal seizures in the cat.
Arch. Neurol. (Chic.) 24, 169-175 (1971)
97. Sher, P.K.: Reduced benzodiazepine receptor binding in cerebral cortical cultures chronically exposed to diazepam.
Epilepsia 24, 313-320 (1983)
98. Shibla, D.B., Gardell, M.A., Neale, J.H.: The insensitivity of developing benzodiazepine receptors to chronic treatment with diazepam, GABA and muscimol in brain cell cultures.
Brain Res. 210, 471-474 (1981)
99. Smith, C.M.: The pharmacology of sedativ/hypnotics, alcohol and anesthetics: Sites and mechanism of action.
In: Martin, W.R.: Handbook of experimental Pharmacology, Vol. 45/1, S. 496-587, Berlin-Heidelberg-New York, Springer Verlag (1977)

100. Snyder, S.H., Enna, S.J.: The role of central glycine receptors in the pharmacologic action of benzodiazepines.
Adv. Biochem. Psychopharmacol. 14, 81-91 (1975)
101. Speckmann, E.J., Caspers, H.: Paroxysmal depolarization and changes in action potentials induced by pentylenetetrazol in isolated neurons of *Helix pomatia*.
Epilepsia 14, 397-408 (1973)
102. Squires, R.F., Braestrup, C.: Benzodiazepine receptors in rat brain.
Nature 266, 732-734 (1977)
103. Stein, L., Wise, C.D., Belluzzi, J.D.: Effects of benzodiazepines on central serotonergic mechanisms.
Adv. Biochem. Psychopharmacol. 14, 29-44 (1975)
104. Stein, L., Wise, C.D., Berger, B.D.: Antianxiety action of benzodiazepines. Decrease in activity of serotonin neurons in the punishment system.
In: Garattini, S., Mussini, E., Randall, L.O.: The Benzodiazepines, S. 299-326, Raven Press New York (1973)
105. Sternbach, L.H., Reeder, E.: Quinazolines and 1,4 benzodiazepines. IV Transformation of 7-chloro-2-methyl-amino-5-phenyl-3H-1,4 benzodiazepine 4-oxide.
J. Org. Chem. 26, 4936-4941 (1961)
106. Stewart, J.T., Story, J.L.: In vitro binding of pentylenetetrazol to plasma proteins.
J. pharm. Sci. 61, 652 (1972)

107. Stone, W.E.: Systemic chemical convulsants and metabolic derangement.
In: Bury, D.M., Walter, R.D.: Experimental Models of Epilepsy, S. 407-432, Raven Press New York (1972)
108. Swinyard, E.A., Castellion, A.W.: Anticonvulsant properties of some benzodiazepines.
J. Pharmacol. exp. Ther. 151, 363-375 (1966)
109. Syapin, P., Rickman, J.: Benzodiazepin receptor increase following repeated pentetrazol injecting.
Europ. J. Pharmacol. 72, 117-120 (1981)
110. Tallman, J.F., Thomas, J.W., Gallager, D.W.: GABA-ergic modulation of benzodiazepine binding sensitivity.
Nature 274, 383-385 (1978)
111. Tallman, J.F., Paul, S.M., Skolnick, P., Gallager, D.W.: Receptors for the age of anxiety: Pharmacology of the benzodiazepines.
Science 207, 274-281 (1980)
112. Ticku, M.K., Olsen, R.W.: Interaction of barbiturates with dihydropicrotoxinin binding sites related to the GABA receptor-ionophore system.
Life Sci. 22, 1643-1652 (1978)
113. Toffano, G., Guidotti, A., Suria, A., Costa, E.: A molecular mechanism of the action of benzodiazepines on GABA receptors.
Fed. Proc. 37, 3655 (1978)
114. Trolle, E.: Diazepam (Valium) in the treatment of epilepsy. A report of fifty cases.
Acta neurol. Scand. 41, Suppl. 13, 535-539 (1965)

115. Unnerstall, J.R., Kuhar, M.J., Niehoff, D.L., Palacios, J.M.: Benzodiazepine receptors are coupled to a subpopulation of γ -aminobutyric acid (GABA) receptors: Evidence from a quantitative autoradiographic study.
J. Pharmacol. exp. Ther. 218, 797-804 (1981)
116. Vohland, H.W., Koransky, W.: Effect of α -hexachlorocyclohexane on metabolism and excretion of pentetrazol (Cardiazol) in the rat
Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 273, 99-108 (1972)
117. Wilensky, A.J., Levy, R.H., Troupin, A.S., Motetti-Ojeman, L., Friel, P.: Chlorazepate kinetics in treated epileptics.
Clin. Pharmacol. Ther. 24, 22-30 (1978)
118. Williamson, T.L., Crill, W.E.: The effects of pentylene-tetrazol on molluscan neurons. I. Intracellular recording and stimulation.
Brain Res. 116, 217-229 (1976a)
119. Williamson, T.L., Crill, W.E.: The effect of pentylene-tetrazol on molluscan neurons. II. Voltage clamp studies.
Brain Res. 116, 231-249 (1976b)
120. Wilson, W.A., Escueta, A.V.: Common synaptic effects of pentylenetetrazol and penicillin.
Brain Res. 72, 168-171 (1974)
121. Wise, C.D., Berger, B.D., Stein, L.: Benzodiazepines: Anxiety-reducing activity by reduction of serotonin turnover in the brain.
Science, 177, 180-183 (1972)

122. Wood, J.H., Hare, T.A., Glaeser, B.S., Ballenger, J.C.,
Post, R.M.: Low cerebrospinal fluid γ -amino-
butyric acid content in seizure patients.
Neurology 29, 1203-1208 (1979)
123. Woodbury, D.M.: Convulsant drugs: Mechanism of action.
In: Glaser, G.H., Penry, K.H., Woodbury, D.M.:
Antiepileptic Drugs: Mechanism of Action,
S. 249-303, Raven Press New York (1980)
124. Yonekawa, W.D., Kupferberg, H.J., Woodbury, D.M.: Relation-
ship between pentylenetetrazol- induced seizures
and brain pentylenetetrazol levels in mice.
J. Pharmacol. exp. Ther. 214, 589-593 (1980)
125. Young, J.A.C., Brown, D.A., Kelly, J.S., Schon, F.: Auto-
radiographic localization of sites of [^3H]-amino-
butyric acid accumulation in peripheral autonomic
ganglia.
Brain Res. 63, 479-486 (1973)
126. Zsilla, G., Cheney, D.L., Costa, E.: Regional changes in
the rate of turnover of acetylcholine in rat
brain following diazepam or muscimol.
Naunyn Schmiedeberg's
Arch. Pharmacol. 294, 251-255 (1976)

Für die Überlassung des Themas, die wissenschaftliche und praktische Anleitung bei der Durchführung der Versuche, sowie bei der Abfassung dieser Dissertation bin ich Herrn Prof. Dr. H.-H. Frey zu großem Dank verpflichtet.

Weiterhin danke ich Herrn Dr. W. Scheuler (Klinikum Charlottenburg) für seine Hilfe bei der Auswertung und Beschreibung der Elektroenzephalogramme.

Mein ganz besonderer Dank gilt allen Mitarbeitern des Laboratoriums für Pharmakologie und Toxikologie für die gewährte technische Hilfe.

LEBENS LAUF

10. 9. 1951	geboren in Rutesheim
1958 - 1963	Grundschulbesuch in Rutesheim
1963 - 1965	Besuch der Realschule in Rutesheim
1965 - 1971	Besuch des Albert-Schweitzer Gymnasiums in Leonberg
1971 - 1973	Wehrdienst
1973 - 1976	Chemiestudium an der Universität Stuttgart
1976 - 1981	Veterinärmedizin-Studium an der Freien Universität Berlin
Dez. 1981	Approbation als Tierarzt
Jan. 1982 - Nov. 1983	Arbeit an meiner Dissertation im Labora- torium für Pharmakologie und Toxikologie der Freien Universität Berlin

